



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química  
**2001**

**João Paulo  
Costa Tomé**

**síntese e avaliação biológica de porfirinas  
anfifílicas**



**João Paulo  
Costa Tomé**

**síntese e avaliação biológica de porfirinas  
anfifílicas**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor José Abrunheiro Silva Cavaleiro e da Professora Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado da Silva Neves, respectivamente Professor Catedrático e Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. José Joaquim Costa Cruz Pinto**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. José Abrunheiro da Silva Cavaleiro**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva**  
Professor Catedrático da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Maria da Graça de Pinho Morgado da Silva Neves**  
Professora Associada da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter**  
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Prof. Dr. Maria Luísa Valdeira da Silva**  
Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

**Prof. Dr. Maria do Amparo Ferreira Faustino**  
Assistente Convidada da Universidade de Aveiro

Aos meus Pais;

À Rosibel e ao João, nosso filho, pelo amor que sempre me deram e a compreensão pelas horas, dias, que estive ausente, durante a execução deste trabalho.

A eles dedico esta obra.

Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, 14-02-1933

## agradecimentos

A realização do presente trabalho deve-se em grande parte ao contributo de algumas pessoas, a quem gostaria de agradecer:

Ao Professor José Cavaleiro, os conhecimentos científicos que me transmitiu enquanto meu professor e supervisor científico. À amizade e compreensão perante alguns dos problemas que foram surgindo ao longo destes anos. À Professora Graça Neves, co-orientadora científica, a sua presença constante e amiga, as palavras encorajadoras que me estimularam nas horas mais difíceis. As suas qualidades humanas fazem dela a pessoa mais admirável.

Ao Professor Augusto Tomé, toda a amizade e apoio de um irmão.

À Professora Luísa Valdeira, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, a sua orientação e o apoio que me foi dando ao longo do trabalho e a paciência com que me deu a conhecer o mundo da biologia celular.

Ao Professor Giulio Jori, do Departamento de Biologia da Universidade de Pádua (Itália), a oportunidade de frequentar um estágio de avaliação biológica junto do seu grupo. Toda a amabilidade com que me recebeu e a simpatia com que me transmitiu o “bichinho” da Terapia Fotodinâmica.

Ao Professor Artur Silva, a amizade e a sempre pronta ajuda, como só ele sabe dar, na análise de alguns dos espectros de RMN.

Às Doutoradas Marina Soncin e Alessandra Busetti, a amizade, a ajuda e a estreita colaboração aquando da minha estadia em Pádua. A elas agradeço ainda as quantificações de fotossensibilizador e de proteína nos estudos de acumulação de fotossensibilizador nas diferentes células bacterianas.

Ao Professor Manuel António Coimbra, as sugestões e a disponibilidade com que contei do grupo de Bioquímica, nomeadamente na liofilização de algumas amostras.

Aos Professores, Armando Silvestre e Mário Simões agradeço as sugestões e pronta ajuda na formatação do texto no “Word”.

Às Dr.as Fátima Condesso e Mimi, e à Professora Rosarinho, a amizade e a ajuda que sempre me têm dado.

Ao Roger Enes e à Cristina Alonso, a amizade e a pronta substituição de trabalho docente, que me permitiu realizar o estágio na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Ao Hilário Tavares e à Cristina Barros pela disponibilidade que sempre demonstraram para a elaboração dos espectro de RMN e de Massa, respectivamente.

À Filipa Mendonça, os ensinamentos laboratoriais em virologia, aquando da minha estadia em Lisboa e a excelente colaboração que tem desenvolvido nos ensaios das nossas porfirinas como antivirais.

A todos os amigos que de uma maneira mais directa ou indirecta contribuiriam na elaboração desta tese.

A todos os colegas e amigos do grupo do Professor Jori, em especial à Michela, à Clara e ao Thameur o companheirismo com que me receberam aquando da minha estadia em Pádua.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Química da Universidade de Aveiro que, de alguma forma, acompanharam e apoiaram a realização deste trabalho.

À Universidade de Aveiro, muito em especial ao Departamento de Química. Aos Serviços de Documentação, a disponibilização de um gabinete para a escrita desta dissertação.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, a bolsa de doutoramento e os subsídios atribuídos para deslocações a congressos internacionais bem como para o estágio em Pádua.

## resumo

O trabalho descrito nesta dissertação envolveu a síntese, caracterização e avaliação biológica de novos macrociclos porfirínicos com potencial acção farmacológica.

Foram sintetizados vários compostos porfirínicos com estruturas bastante diversificadas, nomeadamente porfirinas ligadas a aminoácidos, a polilisina ou a unidades glicosídicas.

Os compostos derivados de *meso*-tripiridilporfirinas foram cationizados por reacção com iodeto de metilo. Foram também preparados alguns derivados tetra-catiónicos por alquilação da *meso*-tetrapiridilporfirina com haletos de alquilo lineares.

Todos os compostos sintetizados foram caracterizados estruturalmente com recurso a diversas técnicas espectroscópicas, principalmente à ressonância magnética nuclear de protão, de carbono 13 e de flúor 19 (sempre que estes apresentavam átomos de flúor) e à espectrometria de massa.

Parte dos compostos sintetizados foram testados em ensaios biológicos para se avaliar a sua capacidade de inibir bactérias e vírus patogénicos. Foram estudados os efeitos destes compostos sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC e *Staphylococcus aureus* MRSA) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e sobre os vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2). Os resultados obtidos mostraram que alguns dos compostos estudados, mesmo em soluções diluídas, conseguem fotoinactivar bactérias Gram-(+) e Gram-(-), e que por isso são candidatos bastante promissores a agentes antimicrobianos de largo espectro. Os ensaios com vírus mostram que alguns dos compostos testados, nas concentrações não citotóxicas, inibem totalmente os vírus herpes HSV-1 e HSV-2, demonstrando a possibilidade destes compostos poderem vir a pertencer a novas formulações de medicamentos anti-herpéticos.

## abstract

The work described in this thesis is essentially based on the synthesis, structural characterization and biological evaluation of new porphyrin derivatives with potential pharmacological activity.

Several new porphyrin derivatives were synthesized. The structures of these compounds are highly diversified: some porphyrins are linked to amino acids, others to polyisine and many of them are linked to sugar moieties. The *meso*-tripyriddyldiporphyrin compounds were converted into their cationic derivatives by reaction with methyl iodide. Tetra-cationic porphyrins were also obtained by reaction of *meso*-tetrapyriddyldiporphyrin with alkyl halides. All the synthesized compounds were characterized by nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, ultraviolet-visible spectroscopy and whenever possible, by microanalysis.

Some of the new compounds were screened for bactericidal and virucidal activities. The biological effects of these compounds were tested against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC e *Staphylococcus aureus* MRSA) and Gram-negative (*Escherichia coli* e a *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria and also against herpes simplex virus type 1 and type 2 (HSV-1 and HSV-2).

The results show that some of the studied compounds, even in diluted solutions, can inhibit completely the development of Gram-(+) and Gram-(-) bacteria when irradiated with light. Those are promising candidates to wide-spectrum antibiotics. The studies carried out with virus show that some of the studied compounds, even at non-citotoxic concentrations, can inactivate completely the virus HSV-1 and HSV-2. Those compounds may be used in new medicinal anti-herpetic formulations.



# Índice

Agradecimentos	i
Resumo	v
Abstract	vii
Abreviaturas	xv
Nomenclatura das porfirinas	xvii

## **Capítulo I** **1**

### **Introdução** **1**

<u>1.1 Macro ciclos tetrapirrólicos – Considerações gerais</u>	3
<u>1.2 Síntese de macrociclos porfirínicos</u>	5
<u>1.2.1 Síntese de porfirinas <i>meso</i>-substituídas</u>	6
<u>1.2.1.1 Síntese de porfirinas <i>meso</i>-tetra-substituídas simétricas</u>	6
<u>1.2.1.2 Síntese de porfirinas <i>meso</i>-tetra-substituídas assimétricas</u>	10
<u>1.2.1.3 Síntese de porfirinas 5,15-di-substituídas</u>	11
<u>1.3 Propriedades físicas e químicas do macrociclo porfirínico</u>	13
<u>1.4 Reactividade do macrociclo porfirínico</u>	16
<u>1.5 Terapia da luz</u>	19
<u>1.5.1 Breve perspectiva histórica</u>	19
<u>1.5.2 Terapia fotodinâmica</u>	20
<u>1.5.2.1 Mecanismo da terapia fotodinâmica</u>	23
<u>1.6 Referências</u>	29

## **Capítulo II** **31**

### **Síntese e estudos fotobactericidas de porfirinas ligadas a polilisina** **31**

<u>2.1 Introdução</u>	33
<u>2.2 Síntese de porfirinas ligadas a polilisina</u>	37
<u>2.2.1 Síntese de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina</u>	38
<u>2.2.2 Estudos de optimização das condições de acoplamento</u>	41
<u>2.2.2.1 Activação do grupo carboxílico</u>	41

2.2.2.2 Acoplamento da porfirina activada 5 ao éster metílico da glicina e à lisina	45
2.2.3 Metilação dos compostos 1, 5 e do dímero 10	48
2.2.4 Acoplamento das porfirinas 1 e 11 a polilisina com 1 a 4 KD	50
2.2.4.1 Reacção do éster activado 5 a polilisina	50
2.2.4.2 Reacção do éster activado metilado 12 a polilisina	52
2.2.4.3 Metilação total do polímero não-catiónico	53
2.3 Ensaio bacteriológico	55
2.3.1 Estudos e resultados de fotoestabilidade dos compostos	58
2.3.2 Estudos de fotoinactivação de bactérias na presença dos derivados porfirínicos	60
2.3.3 Determinação da quantidade de fotossensibilizador ligado às células bacterianas	64
2.3.4 Discussão dos resultados obtidos	70
2.4 Conclusões	74
2.5 Parte experimental da síntese	74
2.5.1 Reagentes, solventes e equipamento	74
2.5.2 Síntese de porfirinas ligadas à polilisina	76
2.5.2.1 Síntese de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina	76
2.5.2.2 Estudos de optimização das condições de acoplamento	79
2.5.2.2.1 Activação do grupo carboxílico	79
2.5.2.2.2 Acoplamento da porfirina activada 5 ao éster metílico da glicina e à lisina	81
2.5.2.3 Metilação dos compostos 1, 5 e do dímero 10	82
2.5.2.4 Acoplamento das porfirinas 1 e 11 a polilisina com 1 a 4 KD	83
2.6 Parte experimental dos ensaios biológicos	86
2.6.1 Meios, reagentes, solventes, material e equipamento utilizados	86
2.6.2 Material porfirínico e células bacterianas	87
2.6.3 Estudos de fotoestabilidade dos compostos	89
2.6.4 Estudos de fotoinactivação de bactérias na presença dos derivados porfirínicos	89
2.6.5 Determinação da quantidade de fotossensibilizador ligado às células	90

<u>2.7 Referências</u>	92
<b><u>Capítulo III</u></b>	<b>95</b>
<b><u>Síntese de porfirinas acopladas a unidades glicosídicas. Avaliação da actividade antiviral nos vírus herpes simplex tipos 1 e 2.</u></b>	<b>95</b>
<u>3.1 Introdução</u>	97
<u>3.2 Síntese de novos fotossensibilizadores porfirínicos acoplados a unidades glicosídicas</u>	101
<u>3.2.1 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a glucose</u>	103
<u>3.2.2 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose</u>	106
<u>3.2.3 Acoplamento de <i>meso</i>-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a galactose</u>	109
<u>3.2.4 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose</u>	111
<u>3.2.5 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina a galactose</u>	113
<u>3.2.5.1 Metilação dos compostos 30 e 31</u>	116
<u>3.3 Cationização da <i>meso</i>-tetrapiridilporfirina</u>	117
<u>3.4 Acoplamento de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina a açúcares</u>	119
<u>3.4.1 Síntese de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina</u>	120
<u>3.4.2 Funcionalização da 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina</u>	122
<u>3.4.2.1 Formilação em condições de Vilsmeier</u>	123
<u>3.4.2.2 Descomplexação das metaloporfirinas formiladas</u>	125
<u>3.4.2.3 Reacção de Wittig e remoção do grupo <i>t</i>-butilo</u>	126
<u>3.4.3 Acoplamento às unidades glicosídicas</u>	129
<u>3.4.3.1 Reacção com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetil-<math>\alpha</math>-D-glucopiranosose</u>	129
<u>3.4.3.2 Síntese de 5-[2-(1,2:3,4-di-<i>O</i>-isopropilideno-<math>\alpha</math>-D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina</u>	133
<u>3.5 Ensaio biológicos em vírus</u>	133
<u>3.5.1 Manutenção da linha celular e preparação de placas com células</u>	135
<u>3.5.2 Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos compostos</u>	137
<u>3.5.3 Produção de vírus</u>	138
<u>3.5.4 Titulação de vírus</u>	139

<a href="#"><u>3.5.5 Estudos de inactivação dos vírus na presença das drogas</u></a>	139
<a href="#"><u>3.5.5.1 Efeito na formação de placas</u></a>	139
<a href="#"><u>3.5.5.2 Efeito no ciclo replicativo viral</u></a>	141
<a href="#"><u>3.5.5.3 Efeito directo ou virucida</u></a>	142
<a href="#"><u>3.5.6 Apresentação e discussão dos resultados obtidos</u></a>	143
<a href="#"><u>3.6 Conclusões</u></a>	148
<a href="#"><u>3.7 Parte experimental da síntese</u></a>	151
<a href="#"><u>3.7.1 Reagentes, solventes e equipamento</u></a>	151
<a href="#"><u>3.7.2 Síntese de novos fotossensibilizadores porfirínicos acoplados a unidades glicosídicas</u></a>	152
<a href="#"><u>3.7.2.1 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a glucose</u></a>	152
<a href="#"><u>3.7.2.2 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose</u></a>	155
<a href="#"><u>3.7.2.3 Acoplamento de <i>meso</i>-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a galactose</u></a>	157
<a href="#"><u>3.7.2.4 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose</u></a>	158
<a href="#"><u>3.7.2.5 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina a galactose</u></a>	161
<a href="#"><u>3.7.2.5.1 Metilação dos compostos 30 e 31</u></a>	162
<a href="#"><u>3.7.3 Cationização de <i>meso</i>-tetrapiridilporfirina</u></a>	164
<a href="#"><u>3.7.4 Acoplamento de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina a açúcares</u></a>	166
<a href="#"><u>3.7.4.1 Síntese de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina</u></a>	166
<a href="#"><u>3.7.4.2 Funcionalização da 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina</u></a>	168
<a href="#"><u>3.7.4.2.1 Formilação em condições de Vilsmeier</u></a>	168
<a href="#"><u>3.7.4.2.2 Descomplexação das porfirinas formiladas</u></a>	169
<a href="#"><u>3.7.4.2.3 Reacção de Wittig e remoção do grupo <i>t</i>-butilo</u></a>	170
<a href="#"><u>3.7.4.3 Acoplamento às unidades glicosídicas</u></a>	172
<a href="#"><u>3.7.4.3.1 Reacção com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetil-<math>\alpha</math>-D-glucopiranosose</u></a>	172
<a href="#"><u>3.7.4.3.2 Síntese de 5-[2-(1,2:3,4-di-<i>O</i>-isopropilideno-<math>\alpha</math>-D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina</u></a>	174

<u>3.8 Parte experimental dos ensaios biológicos</u>	175
<u>3.8.1 Meios, reagentes, solventes, material e equipamento utilizado</u>	175
<u>3.8.2 Material porfirínico</u>	176
<u>3.8.3 Manutenção da linha celular e preparação de placas de teste com células</u>	176
<u>3.8.4 Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos compostos</u>	178
<u>3.8.5 Produção de vírus</u>	178
<u>3.8.6 Titulação de vírus</u>	179
<u>3.8.7 Estudos de inactivação dos vírus na presença das drogas</u>	180
<u>3.8.7.1 Efeito na formação de placas</u>	180
<u>3.8.7.2 Efeito no ciclo replicativo viral</u>	180
<u>3.8.7.3 Efeito directo ou virucida</u>	181
<u>3.9 Referências</u>	182
 <u>Anexos</u>	 <b>185</b>

## Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
Ar	arilo
BHA	infusão de agar de cérebro e coração
BHI	infusão de cérebro e coração
CMNC	concentração máxima não citotóxica
d	duplete
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplete de dupletos
DCC	<i>N,N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DDQ	5,6-diciano-2,3-diclorobenzoquinona
DME	meio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidade óptica
Dt	duplo tripleto
EM	espectrometria de massa
eq.	equivalente
FAB	ionização por bombardeamento com átomos rápidos
FCS	soro fetal de vitela
GPC	cromatografia de exclusão molecular
HIV	vírus da imunodeficiência humana
Hp	hematoporfirina
HpD	derivado da hematoporfirina
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão
HSV-1	vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	vírus herpes simplex tipo 2
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>J</i>	constante de acoplamento
log $\epsilon$	logaritmo da absorvidade molar
m	multipleto

m/z	relação massa/carga
M <sup>+</sup> •	ião molecular
(M+H) <sup>+</sup>	ião molecular protonado
PBS	tampão fosfato salino
PDT	terapia fotodinâmica
p.f.	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
q	quarteto
R <sub>f</sub>	factor de retenção (retardamento)
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de protão
RMN <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>19</sup> F	ressonância magnética nuclear de flúor 19
RNA	ácido ribonucleico
s	singuleto
SDS	dodecilsulfato de sódio
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetra-hidrofurano
TLC	cromatografia em camada fina
TMS	tetrametilsilano
TPP	<i>meso</i> -tetrafenilporfirina
UFC	unidade formadora de colónias
UFP	unidade formadora de placas
UV/Vis	ultravioleta/visível
δ	desvio químico em ppm
λ <sub>máx.</sub>	comprimento de onda para os máximos de absorvência
ε	absortividade molar

## Nomenclatura das porfirinas

As porfirinas são compostos tetrapirrólicos formados por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas. Actualmente existem dois sistemas de nomenclatura para estes macrociclos. Um proposto por Hans Fischer, e mais recentemente, um proposto pela IUPAC.

No sistema proposto pela escola de Fischer os carbonos externos dos anéis pirrólicos são numerados de 1 a 8. Estas posições são também designadas por  $\beta$ -pirrólicas. As pontes metínicas são designadas pelas letras gregas, alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ) e são normalmente conhecidas por posições *meso*.

Com o surgimento, cada vez maior, de novas porfirinas e de técnicas de análise, como por exemplo o RMN de  $^{13}\text{C}$  ou o Raio-X, o sistema numérico proposto por Fischer, em que apenas metade das posições do macrociclo estavam representadas, não era o mais conveniente. Foi necessário introduzir uma nomenclatura com regras claras e que contemplasse todos os átomos do anel. Assim a IUPAC recomendou um sistema onde os vinte e quatro átomos pertencentes ao macrociclo fossem numerados de 1 a 24 (fig. 1).

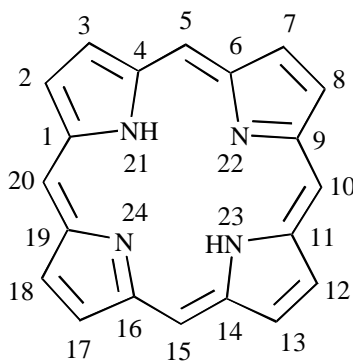


Figura 1 Sistema de numeração proposto pela IUPAC.

Convencionalmente os hidrogénios ligados aos átomos de azoto encontram-se no N-21 e N-23. As designações *meso* e  $\beta$ -pirrólicas continuam a ser aceites neste sistema.

Com a nomenclatura trivial a entrar gradualmente em desuso, nesta dissertação seguiu-se, o mais possível, o sistema proposto pela comissão da IUPAC para a nomenclatura destes compostos.



# **Capítulo I**

## **Introdução**

## 1.1 Macrociclos tetrapirrólicos – Considerações gerais

*Man cannot give a true reason for the grass under his feet  
why it should be green rather than red or any other color.*

Sir Walter Raleigh

History of the World: Preface (1614)

Os macrociclos porfirínicos, nas suas várias formas, reduzidas, oxidadas e complexadas estão presentes em funções vitais como a respiração, o transporte de electrões, a fotossíntese, diversas acções enzimáticas e ainda na desintoxicação de drogas.<sup>1,2</sup> A existência de vida, tal como a concebemos hoje, requer a presença de porfirinas.<sup>3</sup>

Na respiração estão envolvidas as hemoproteínas, designação dada às proteínas que apresentam, ligado à respectiva cadeia polipeptídica, um ou mais grupos prostéticos conhecidos por heme **1.1** (fig. 1.1).

Na fotossíntese a luz é absorvida por centenas de moléculas de clorofila **1.2** (fig. 1.1) que transferem a sua energia, resultante da fotoexcitação, para um “centro de reacção” onde ocorre a transformação de energia luminosa em energia química, necessária para converter o dióxido de carbono e água em hidratos de carbono essenciais à vida.

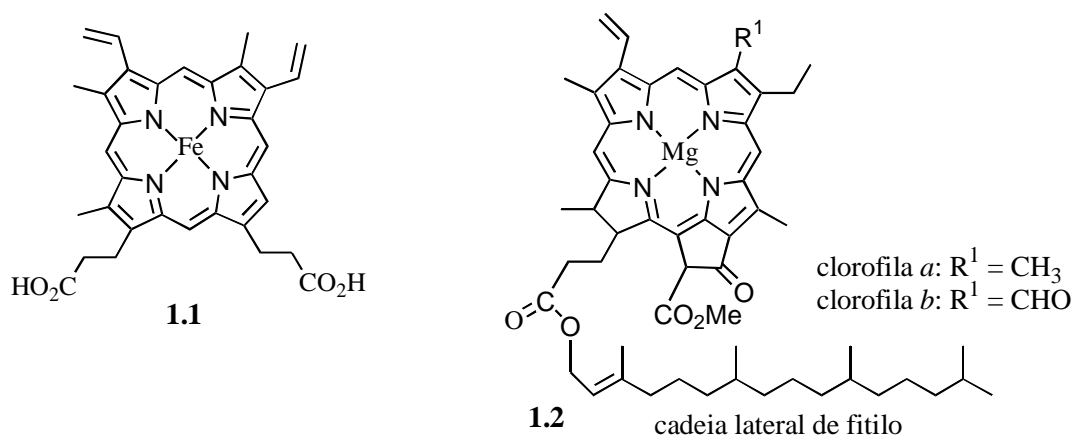


Figura 1.1 Estruturas do grupo heme **1.1** e das clorofilas *a* e *b* **1.2**.

Os citocromos, responsáveis pelo transporte de electrões, são também eles hemoproteínas, fazendo parte do grupo das biomoléculas mais antigas.

Também as cores vermelha, castanha e verde, de um enorme número de materiais biológicos são devidas às hemoproteínas. Verdeil em 1844, cerca de duzentos anos depois de Raleigh ter dito as palavras apresentadas no início deste capítulo, converteu a clorofila *a* num pigmento vermelho e sugeriu uma relação estrutural entre a clorofila e o grupo heme.

Se há centenas de anos eram os melhores metafísicos que se questionavam do porquê das cores da relva e do sangue, mais recentemente são os químicos, os físicos, os biólogos e os médicos a questionarem-se das potencialidades de análogos desses pigmentos responsáveis por aquelas cores. Na verdade, a área de investigação em porfirinas é uma das mais excitantes, e estimulantes para estes cientistas.

Enquanto em 1967 o número de publicações anuais sobre porfirinas foi de 234, em 1994 tinha passado para 1914 publicações.<sup>4</sup> Actualmente muitos mais artigos sobre síntese e uso de porfirinas e análogos são publicados todos os anos, numa série de periódicos em todo o Mundo. Além do interesse científico deste tipo de compostos, verifica-se também um aumento do seu interesse comercial. Disso faz prova o grande número de patentes registadas nos organismos mundiais responsáveis por esses registos. Numa pesquisa realizada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial na base de dados BERDOC, em 27/04/2000, surgiram 1450 patentes sobre porfirinas, com maior incidência nos últimos anos.

O grande interesse nestes compostos baseia-se na sua importância biológica e na possibilidade da sua aplicação em áreas tão distintas<sup>5</sup> como as de: catálise, catálise enzimática,<sup>6,7</sup> modelos de sistemas fotossintéticos,<sup>8</sup> transportadores artificiais de oxigénio, sensores químicos,<sup>9</sup> sistemas optoelectrónicos, semicondutores, supercondutores, cristais líquidos,<sup>10</sup> agentes biocidas, nomeadamente como fungicidas<sup>11</sup> e insecticidas<sup>12</sup>, e na terapia fotodinâmica (PDT).<sup>2,13,14,15</sup>

As porfirinas são moléculas com uma enorme capacidade de actuarem como fotossensibilizadores quando irradiadas com luz. Esta é, certamente, uma das áreas mais promissoras para estes compostos. As expectativas da indústria farmacêutica, entre outras relacionadas, são grandes e esperam conseguir bons proveitos nesta nova área da saúde. A PDT é já hoje uma modalidade em uso no diagnóstico e tratamento do cancro e o seu princípio está a ser aplicado a muitas outras áreas, nomeadamente na inactivação ou eliminação de microrganismos,<sup>16</sup> vírus<sup>17</sup> e príões<sup>18</sup> em fluídos ou materiais contaminados e em infecções.<sup>19</sup>

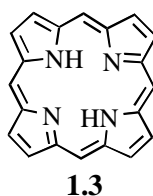
Devemos aqui chamar a atenção para uma das mais recentes áreas de investigação onde se aplicam as porfirinas, a inactivação de priões.\* Estes há bem pouco tempo causaram uma das maiores crises alimentares na Europa, devido à epidemia de encefalopatia espongiforme que se abateu sobre os bovinos europeus. Com a epidemia surgiu uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos. Estes acontecimentos têm aumentado a urgência em desenvolver terapias para as encefalopatias espongiformes transmissíveis ou outras doenças causadas por priões.<sup>18,20</sup>

## 1.2 Síntese de macrociclos porfirínicos

Um grande número de porfirinas naturais e sintéticas, com variadíssimas estruturas químicas e características, podem ser isoladas da natureza ou sintetizadas em laboratório. A síntese de novos materiais porfirínicos pode ocorrer segundo duas vias gerais: através de intermediários pirrólicos, ou introduzindo modificações em pigmentos naturais, ou mesmo em porfirinas já sintetizadas.

Durante a primeira parte do século XX, e particularmente entre 1920 e 1930, o estudo da síntese de porfirinas estava nos seus primeiros dias. Hans Fischer e a sua equipa em Munique realizaram um trabalho que envolveu o estudo da estrutura e síntese de quase todos os pigmentos tetrapirrólicos. Este trabalho valeu a Fischer, em 1930, o Prémio Nobel da Química.

Em 1935 Fischer e Gleimm, prepararam pela primeira vez a porfirina **1.3**, a partir da condensação de pirrol e formaldeído em ácido fórmico em refluxo. No mesmo ano Rothmund publicou a síntese de **1.3**. Ainda hoje, esta porfirina é uma das que são preparadas com rendimentos mais baixos.<sup>21</sup>



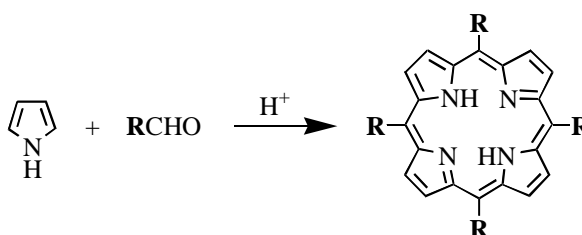
---

\* Partículas proteicas infecciosas, causadoras de doenças neurológicas

Dada a existência de variadíssimas rotas de síntese de macrociclos tetrapirrólicos, e consequentemente uma vastíssima bibliografia sobre a síntese deles,<sup>22-25</sup> vamos de uma forma breve, apresentar a evolução das rotas de síntese que aplicámos na preparação dos macrociclos usados neste trabalho.

### 1.2.1 Síntese de porfirinas *meso*-substituídas

Algumas das porfirinas *meso*-substituídas exigem processos de síntese bastante elaborados,<sup>26,27</sup> no entanto outras são de síntese fácil, podendo mesmo prepararem-se num único passo. A partir da condensação de pirrol com um aldeído obtêm-se porfirinas simétricas (esquema 1.1). No entanto, se na reacção de condensação for usada uma mistura de aldeídos obtêm-se porfirinas assimétricas. Esta grande versatilidade reaccional permite a construção de várias porfirinas sem haver necessidade de elaborar rotas de síntese complexas.

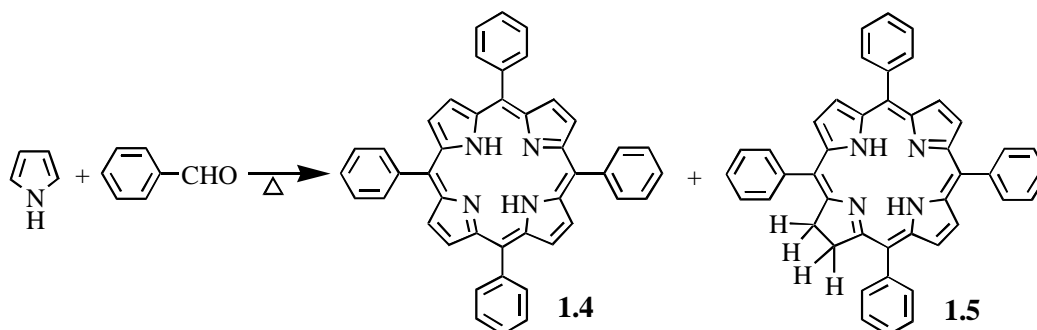


Esquema 1.1

#### 1.2.1.1 Síntese de porfirinas *meso*-tetra-substituídas simétricas

A síntese da *meso*-tetrametilporfirina foi efectuada pela primeira vez por Rothmund em 1935. Rothmund preparou mais de trinta porfirinas, entre as quais a *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) **1.4** (esquema 1.2). O método era bastante simples, baseando-se no aquecimento de pirrol com os correspondentes aldeídos. A mistura dos dois reagentes em piridina era aquecida a 220 °C durante 48 horas, num tubo selado sob atmosfera de azoto.<sup>2,21,28,29</sup> Os rendimentos eram, na generalidade, inferiores a 5% e

normalmente as porfirinas vinham contaminadas com a correspondente clorina (17,18-dihidroporfirina) **1.5**, pelo que este método foi pouco utilizado.

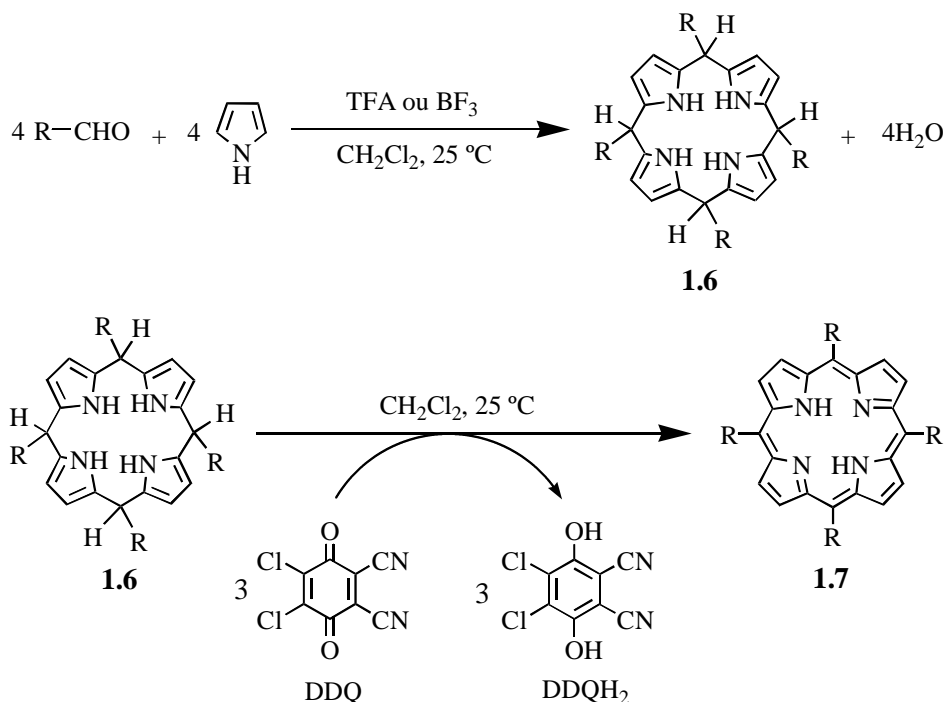


Esquema 1.2

Mais tarde, Calvin e colaboradores, ao adicionarem acetato de zinco à mistura reaccional de Rothmund, obtiveram o complexo de zinco da TPP com o dobro do rendimento (10%) com que obtinham a TPP.<sup>28</sup>

Só nos anos 60, com Adler, Longo e Shergalis é que a síntese de porfirinas *meso*-substituídas, a partir da tetramerização equimolar de pirrol e aldeído, sofreu um empurrão. Estes, ao realizarem a condensação de benzaldeído e pirrol em solventes acídicos em refluxo e na presença de ar, obtiveram a TPP com rendimentos entre os 30-40%.<sup>21,28</sup> No entanto, esta síntese continuava a apresentar o mesmo problema da síntese de Rothmund, relativamente às clorinas. As porfirinas obtidas vinham contaminadas com as respectivas clorinas (5-10%), de difícil separação cromatográfica em larga escala.<sup>2</sup> Para ultrapassar esse problema a mistura porfirina/clorina era previamente tratada com quinonas, as quais oxidavam a clorina à correspondente porfirina, não sendo desse modo necessário proceder à separação da dita mistura. Seguiram-se vários estudos para a oxidação tanto de clorinas como de porfirinogénios (hexa-hidroporfirinas) **1.6** com quinonas, uma vez que o oxigénio do ar não os oxidava eficazmente.<sup>28</sup>

Entre 1979 e 1986, Lindsey desenvolveu uma nova estratégia para a síntese de porfirinas *meso*-substituídas. O processo consistia em desenvolver condições reacionais moderadas, na tentativa de evitar reacções secundárias em todos os passos da formação da porfirina. Para isso usou uma sequência de dois passos: primeiro a condensação até ao porfirinogénio **1.6**, seguindo-se a oxidação deste à porfirina correspondente **1.7** (esquema 1.3).<sup>28</sup>



Esquema 1.3

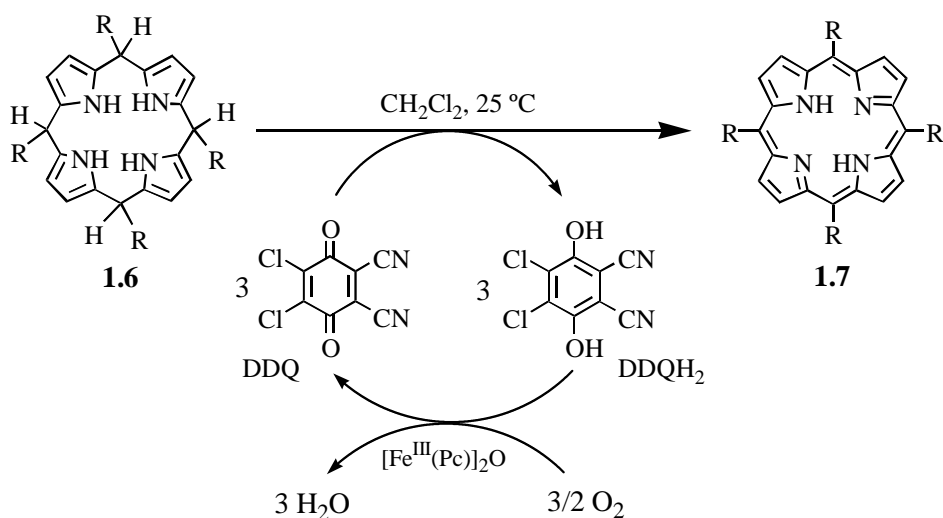
No primeiro passo, deste processo, a condensação do pirrol com o benzaldeído em diclorometano ocorre à temperatura ambiente, utilizando como catalisador os ácidos trifluoroacético ou trifluoreto de boro. A condensação leva entre 30 e 60 minutos.

No segundo passo, também à temperatura ambiente, oxida-se o porfirinogénio com a adição de uma quantidade estequiométrica de DDQ ou *p*-cloranil. Na oxidação com DDQ, em geral, os rendimentos são superiores a 80%.

Este método mostrou-se bastante sensível à concentração dos reagentes, e à concentração do ácido usado como catalisador. Para uma determinada concentração de ácido, os melhores resultados foram obtidos com uma concentração de 10 mM de benzaldeído e pirrol (35-40%). Este método, apesar de não aumentar significativamente o rendimento das porfirinas relativamente ao método de Adler, permitiu o uso de um maior número de aldeídos na preparação de porfirinas.

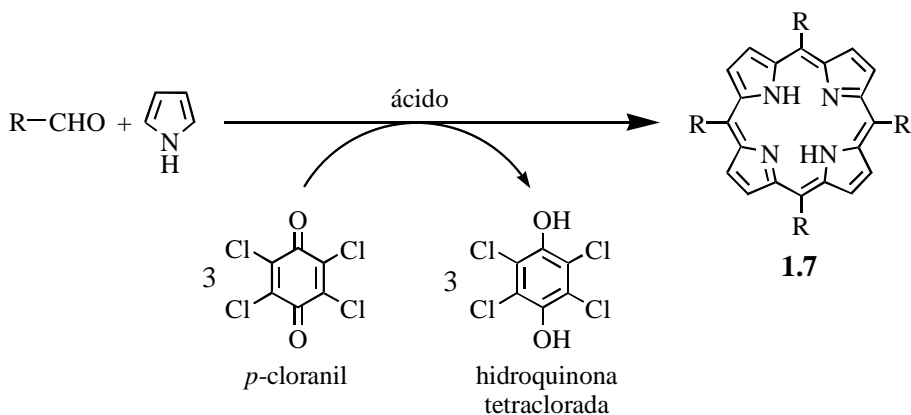
O uso de quinonas, em quantidades estequiométricas, tornam o processo oneroso e a porfirina difícil de purificar. Na tentativa de diminuir a quantidade de quinona necessária para a oxidação, Lindsey voltou-se para a oxidação aeróbica. Uma vez que o oxigénio à temperatura ambiente reage muito lentamente com o porfirinogénio, promoveu vários estudos na tentativa de o tornar mais reactivo, propondo o uso do catalisador  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Pc})]_2\text{O}$ ,

onde Pc é a ftalocianina. Verificou no entanto que aquele catalisador só era eficiente na presença de quinonas (DDQ ou de *p*-cloranil) ou das respectivas hidroquinonas (esquema 1.4). Este processo imita a conversão biológica do protoporfirinogênio-IX à protoporfirina-IX e pode ser usado para a preparação de grandes quantidades de tetra-*aril*porfirinas.<sup>28</sup> É um processo bastante prático porque como o  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Pc})]_2\text{O}$  é insolúvel em diclorometano pode ser facilmente removido da reacção por filtração.



Esquema 1.4

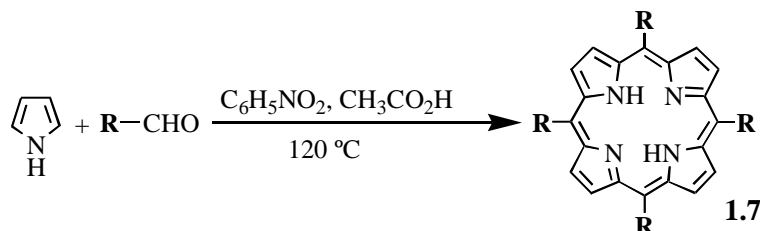
Lindsey desenvolveu ainda estudos para a obtenção de porfirinas num só passo, à temperatura ambiente. No entanto, mesmo nas melhores condições identificadas (esquema 1.5), os rendimentos foram muito menores (18% para a TPP) do que os obtidos nos anteriores processos de dois passos.<sup>28</sup>



Esquema 1.5



O grupo da Universidade de Coimbra, propôs a utilização de uma mistura de ácido acético ou propiónico com 30% de nitrobenzeno para a preparação num só passo de porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas (esquema 1.6).<sup>29</sup> A reacção decorre a 120 °C e leva apenas uma hora a ficar completa.



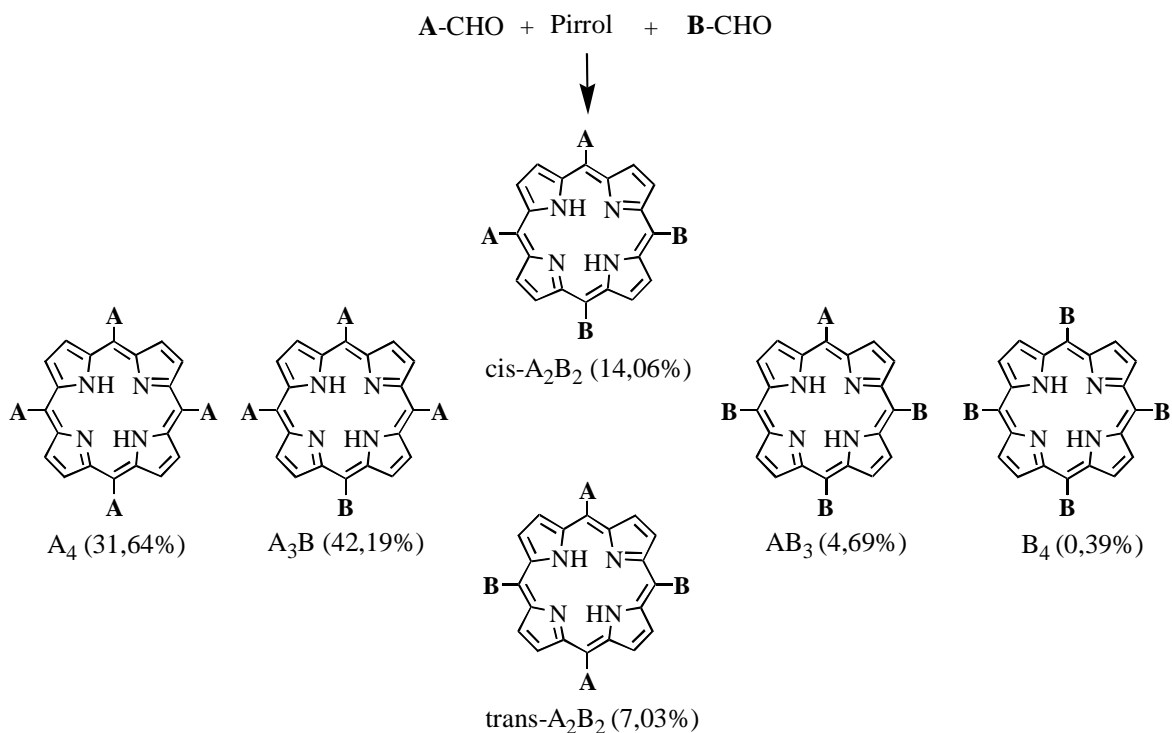
Esquema 1.6

O nitrobenzeno actua como um verdadeiro oxidante de porfirinogénios, gerando as correspondentes porfirinas com alta eficiência. Este novo método permite preparar porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas com melhores rendimentos que os processos apresentados, num único “passo”. Por exemplo, com este método a TPP é hoje facilmente preparada com um rendimento de 50%.

#### 1.2.1.2 Síntese de porfirinas *meso*-tetra-substituídas assimétricas

Quando se promove a condensação de pirrol com uma mistura de aldeídos ocorre a síntese de várias porfirinas, tantas quantas as combinações possíveis. A razão de formação de cada uma delas depende da proporção dos aldeídos e da reactividade destes. Este método, no entanto, só compensa até a um máximo de dois aldeídos diferentes originando à partida um conjunto de seis porfirinas. Quantos mais aldeídos se misturarem, mais compostos porfirínicos diferentes se formam, tornando-se mais difícil e dispendiosa a sua separação.

Tomando como exemplo uma mistura de dois aldeídos, A-CHO e B-CHO na razão de 3:1 obtém-se a combinação de porfirinas apresentadas no esquema 1.7. Neste esquema também se apresenta a percentagem relativa de cada uma delas determinada estatisticamente, considerando a reactividade de ambos os aldeídos igual.<sup>28</sup>



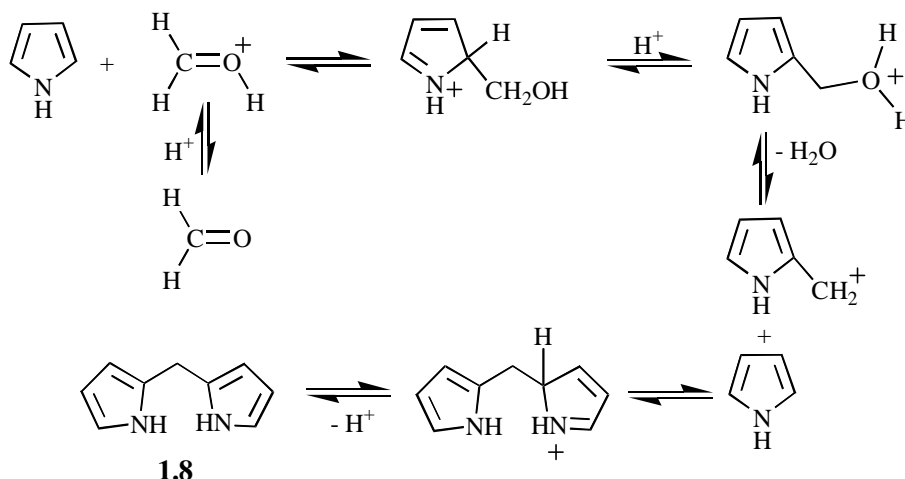
Esquema 1.7

Na prática o rendimento das porfirinas  $A_3B$  no método de Adler ronda os 5%.

Nos nossos estudos preparamos as *meso*-tetra-arilporfirinas de base pela variante do método de Rothmund proposta pelo grupo de Coimbra. Este método, como já tivemos oportunidade de referir consiste na condensação de pirrol com aldeídos numa mistura de ácido acético glacial e nitrobenzeno, em refluxo.

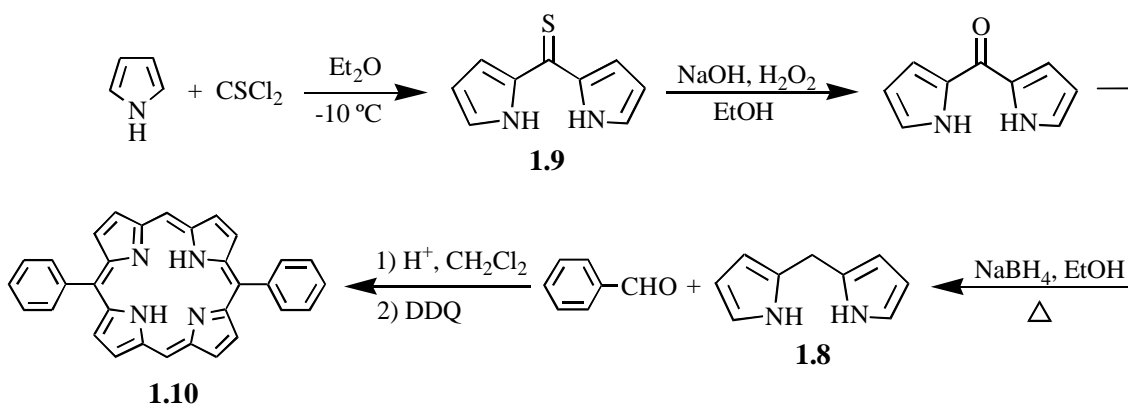
### 1.2.1.3 Síntese de porfirinas 5,15-di-substituídas

As porfirinas di-substituídas nas posições 5 e 15 foram descritas pela primeira vez em 1968 com a preparação da 5,15-difenilporfirina **1.10** (esquema 1.9) com um rendimento de 3%.<sup>30</sup> O baixo rendimento desta estava directamente associado à difícil preparação do precursor dipirrometano **1.8** não substituído nas posições  $\alpha$  e  $\beta$ -pirrólicas. O dipirrometano **1.8** foi preparado pela primeira vez por Treibs e Haberle, por condensação de pirrol com formaldeído em meio ácido (esquema 1.8).<sup>31</sup>



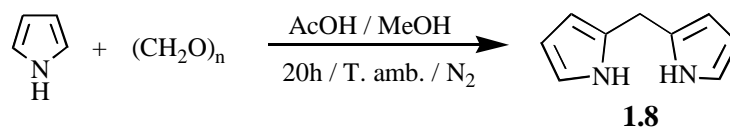
Esquema 1.8

Mais tarde esta rota de síntese foi modificada por Clezy. Este preparou o dipirrometano **1.8** a partir de pirrol e tiocetona (esquema 1.9). O rendimento médio para esta nova rota de síntese de dipirrometano é de cerca de 40%, sendo a tiocetona **1.9** um composto particularmente desagradável de isolar.<sup>30,32</sup>



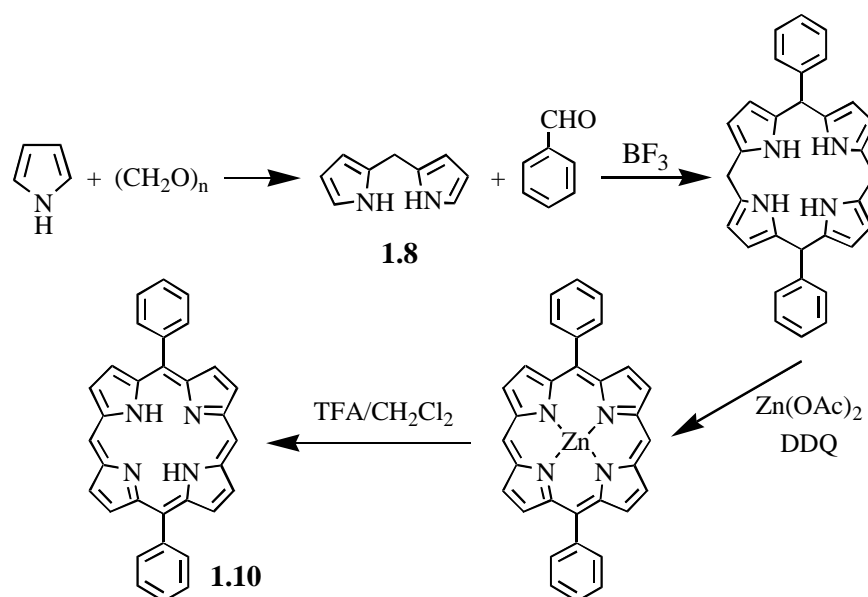
Esquema 1.9

Recentemente, foi apresentada uma nova rota de síntese de dipirrometanos não substituídos nas posições *meso*, num único passo, evitando deste modo a tradicional rota do tiocetona.<sup>32</sup> Nesta rota de síntese o dipirrometano **1.8** foi preparado por condensação directa de paraformaldeído com pirrol em excesso (esquema 1.10). Este, depois da reacção, pode ser facilmente removido por destilação a pressão reduzida à temperatura ambiente e recuperado numa “trap” mergulhada em azoto líquido.



Esquema 1.10

Depois de preparado o dipirrometano, a condensação deste com aldeídos aromáticos ou alifáticos em diclorometano e catalisada por ácido dá, após oxidação com DDQ ou *p*-cloranil na presença de acetato de zinco, a porfirina 5,15-di-substituída com rendimentos que podem ir dos 20 aos 40% (esquema 1.11)

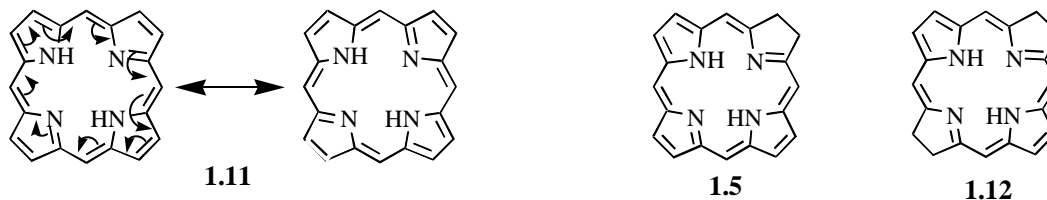


Esquema 1.11

### 1.3 Propriedades físicas e químicas do macrociclo porfirínico

O anel porfirínico **1.11** contém vinte e dois electrões  $\pi$  conjugados, sendo o seu carácter aromático assegurado por apenas dezoito deles. Apesar dos vinte e dois electrões  $\pi$  conjugados seguirem a regra de Hückel para a aromaticidade  $[4n + 2]$ ,  $n = 5$ , apenas dezoito deles são considerados em situação de se deslocalizarem, continuando de acordo com a regra de Hückel para  $n = 4$ . Deste modo, quatro dos electrões  $\pi$ , que não são necessários para a aromaticidade do anel podem reagir para formar clorinas **1.5** (vinte

electrões  $\pi$ ) e bacterioclorinas **1.12** (dezoito electrões  $\pi$ ), sem que desse modo perca a aromaticidade.



Os espectros de visível são outra das características destes compostos, talvez mesmo a mais importante. Cedo foi atribuído à elevada conjugação do sistema electrónico  $\pi$  a intensidade e as cores das porfirinas. As porfirinas apresentam uma banda característica de absorção bastante intensa entre os 390 e 425 nm, designada de banda Soret. Entre os 480 e os 700 nm apresentam ainda duas ou quatro bandas, designadas de bandas Q. A intensidade e o número de bandas que cada composto porfírinico apresenta depende se se encontra complexado ou não, e dos substituintes periféricos que apresenta.

De uma forma geral, as porfirinas livres apresentam as quatro bandas Q que são designadas de IV, III, II, I. Consoante a relação de intensidade entre elas, os espectros (fig. 1.2) são designados de: tipo *etio* (IV > III > II > I), tipo *rhodo* (III > IV > II > I), tipo *oxo-rhodo* (III > II > IV > I) ou tipo *phyllo* (IV > II > III > I).<sup>33</sup>

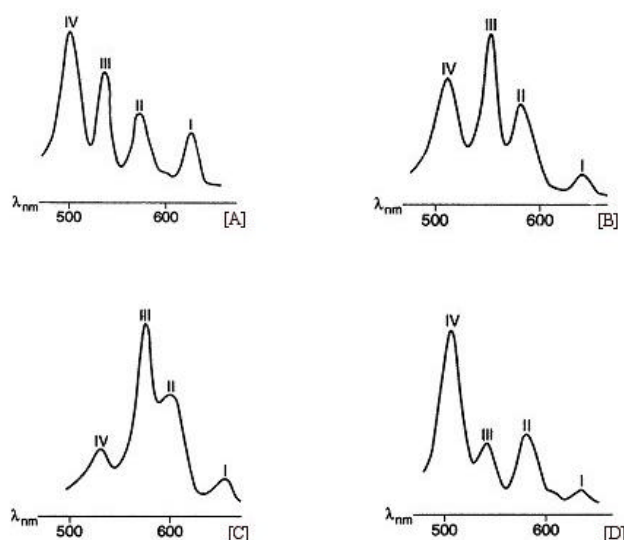


Figura 1.2 Bandas Q das porfirinas livres: tipo *etio* [A], tipo *rhodo* [B], tipo *oxo-rhodo* [C], tipo *phyllo* [D].

As porfirinas complexadas ou protonadas, nos átomos de azoto centrais, apresentam uma maior simetria que as porfirinas livres. Esta característica promove uma simplificação do espectro de visível, passando a apresentar apenas duas bandas Q, designadas de  $\beta$  e  $\alpha$  (fig 1.3).<sup>33</sup> A intensidade relativa das duas bandas pode dar uma ideia da estabilidade do complexo. Assim, quando  $\alpha > \beta$  significa que o complexo metálico é estável.<sup>15</sup>

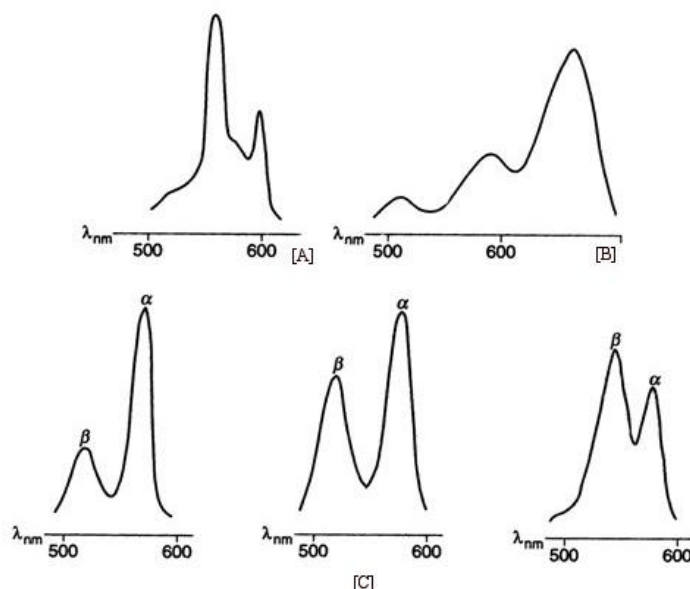


Figura 1.3 Bandas Q das porfirinas protonadas, dicatiónicas [A] e monocatiónicas [B], e de alguns complexos metálicos [C].

Devido à elevada conjugação do sistema electrónico  $\pi$  nos compostos porfirínicos estes apresentam espectros de RMN bastante característicos. As porfirinas livres apresentam um sinal, correspondente à ressonância dos protões que se encontram no interior do anel porfirínico, que surge a campos ainda mais altos ( $\delta$  entre -2 e -3 ppm) do que o dos protões do tetrametilsilano (TMS). Este facto deve-se à forte blindagem que estes protões sofrem por parte da corrente electrónica que gira em torno do anel. Esta corrente, gerada pelos electrões  $\pi$  deslocalizados, desprotege os protões periféricos, deslocando as suas ressonâncias para campos mais baixos ( $\delta$  entre 7 e 9 ppm).<sup>34</sup>

### 1.4 Reactividade do macrociclo porfirínico

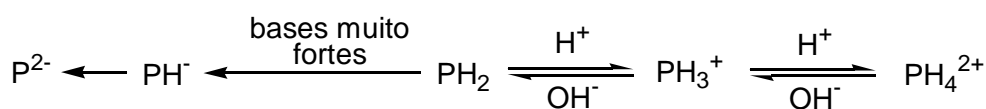
Como já referimos, os macrociclos porfirínicos são compostos aromáticos, apresentando por isso reacções características destes últimos, como por ex. nitração, halogenação, sulfonação, formilação e acilação.

As reacções químicas observadas nestes núcleos podem ser analisadas consoante ocorram no interior ou nas posições periféricas do anel. Na periferia do anel há duas posições, *meso* e  $\beta$ -pirrólicas, que podem sofrer reacção.

De uma maneira breve, vamos abordar as reacções mais importantes tanto no interior como no exterior, e ver como se relacionam umas com as outras.

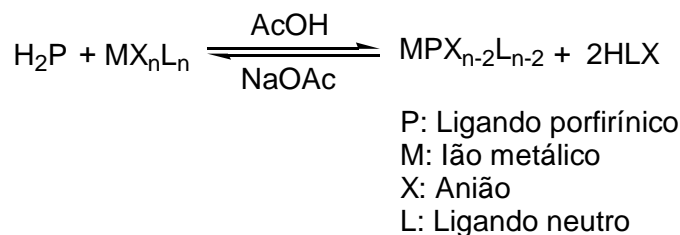
As transformações internas são em grande parte promovidas pelos átomos de azoto das unidades pirrólicas. Estes envolvem-se facilmente em reacções ácido-base (esquema 1.12) e de complexação com metais de coordenação (esquema 1.13).

Os átomos de azoto centrais, na presença de ácido, são então facilmente protonados, dando origem a espécies monocatiónicas e/ou dicatiónicas. Por outro lado quando expostas a bases fortes, como os alcóxidos, dão origem a dianiões. O carácter ácido e básico destes sistemas é influenciado pelos grupos substituintes na periferia do macrociclo.



Esquema 1.12

Através dos azotos internos são capazes de coordenar com uma grande variedade de metais. A estabilidade relativa para as metaloporfirinas comuns é: Fe(III) > Pd > Ni > Cu > Co > Zn > Mg > Cd > Hg > Ca.<sup>35</sup> O ião metálico central apresenta um importante efeito indutor sobre o sistema electrónico- $\pi$ , bastante importante em funções biológicas vitais e em algumas reacções químicas, como se poderá ver a seguir.



Esquema 1.13

São várias as reacções que podem ocorrer na periferia do anel, como por exemplo reacções electrofílicas, nucleofílicas, de oxidação e de redução. Também podem ocorrer reacções nos grupos substituintes periféricos.<sup>35</sup>

Normalmente, as posições *meso* são electronicamente mais reactivas que as posições  $\beta$ -pirrólicas. Pelo contrário, as posições  $\beta$ -pirrólicas são estericamente favorecidas relativamente às primeiras. Estas duas posições apresentam assim diferente reactividade.

Woodward, considerou que as subunidades pirrólicas tentam atingir um estado de sexteto electrónico de modo a manterem-se independentes da conjugação do macrociclo. Segundo esta consideração, os núcleos porfirínicos na forma livre apresentam uma distribuição electrónica onde as posições *meso* se encontram “carregadas” positivamente (fig. 1.4).

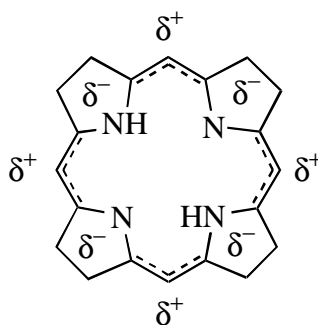


Figura 1.4 Representação da distribuição electrónica segundo Woodward

Como já tivemos oportunidade de referir, nas porfirinas complexadas os metais interferem no sistema electrónico- $\pi$ . Deste modo a reactividade das posições periféricas pode ser determinada pelo efeito electrónico criado nessas posições. São as posições *meso* que apresentam uma maior dependência de reactividade consoante o tipo de metal presente na cavidade do macrociclo. Este efeito pode ser controlado pela escolha do metal a introduzir no núcleo porfirínico. Assim os iões metálicos, pela seguinte ordem Mg(II),



Zn(II), Cu(II), Ni(II), Pd(II), induzem uma electronegatividade crescente na periferia do anel, tornando-o mais susceptível às substituições electrofílicas nas posições *meso*.<sup>14</sup> Por outro lado, metais com um estado de oxidação mais elevado como o Sn(IV) tendem a desactivar estas posições e a activar as  $\beta$ -pirrólicas para ataques electrofílicos.

As reacções mais características destes macrociclos ricos em electrões são, em geral, as de substituição electrofílica, como por exemplo a nitração, a halogenação, a sulfonação, a formilação e a acilação. Estas têm sido estudadas em macrociclos na forma complexada e podem ocorrer nas oito posições  $\beta$  pirrólicas e/ou nas quatro posições *meso*, no caso de estas não se encontrarem substituídas. Nestas condições evita-se a protonação e consequente desactivação do macrociclo.<sup>35</sup>

Um dos exemplos dessas reacções, como já tínhamos apresentado é a formilação. O método mais usado para introduzir um grupo formilo no macrociclo porfirínico é através da reacção de Vilsmeier. Neste método utiliza-se DMF/ $\text{POCl}_3$  para gerar *in situ* a espécie reactiva de Vilsmeier. Apesar do magnésio(II) e do zinco(II) aumentarem a densidade electrónica na periferia do anel, não formam complexos com o macrociclo suficientemente estáveis para suportar as condições ácidas da reacção de Vilsmeier. Assim, os complexos preferidos têm sido os de cobre(II) e níquel(II), uma vez que o compromisso “baixa electronegatividade e pequena labilidade perante ácidos” ser considerado razoável.

Cabe ainda realçar que os complexos de cobre são normalmente mais fáceis de descomplexar que os de níquel, obtendo-se assim a porfirina formilada livre com um rendimento superior do que quando se usam os complexos de níquel. O grupo formilo é muito versátil para posteriores derivatizações.

Como já tínhamos referido, outras reacções bastante importantes, e usadas por nós neste trabalho, são as transformações nos grupos substituintes periféricos. Muitas vezes começa-se por se sintetizar macrociclos porfirínicos “simples”, tendo em vista a estratégia a seguir para chegar ao produto final pretendido, progressivamente mais elaborados. Para isso, normalmente, os aldeídos usados na construção das porfirinas contêm os grupos funcionais mais convenientes para ligar às porfirinas outros compostos.

## 1.5 Terapia da luz

### 1.5.1 Breve perspectiva histórica

Desde cedo que a Humanidade usa as propriedades da luz solar na promoção da saúde e no tratamento de enfermidades. Os Gregos e os Romanos, tinham mesmo um espaço exclusivamente dedicado para esse efeito - o “solarium”.

O uso de luz no tratamento de enfermidades envolvendo processos que promovem a excitação electrónica das biomoléculas é designado por fototerapia. Apesar da técnica ser ancestral, o conceito moderno de fototerapia foi introduzido por Finser, em 1901, depois de verificar que a luz solar podia ser usada no tratamento de lúpus vulgaris, recebendo em 1903 o Prémio Nobel da Medicina por essa descoberta. Este princípio é ainda hoje muito importante em medicina, sendo utilizado, por exemplo, no tratamento do raquitismo, de certas doenças dermatológicas e da bilirrubina neonatal.<sup>36,37</sup>

Os Egípcios<sup>38</sup> e os indianos,<sup>36</sup> 2000 anos a.C. mastigavam certas plantas ou ingeriam extractos dessas plantas e posteriormente expunham-se ao sol para tratarem, com sucesso, o vitiligo – doença caracterizada pela despigmentação da pele e dos pêlos correspondentes. Esta combinação de droga e luz foi designada por terapia fotoquímica. Actualmente este tipo de terapia é utilizado no tratamento da psoríase,<sup>36</sup> doença cutânea caracterizada pela descamação da epiderme provocada pela inflamação crónica da derme.

Em 1904 Hermann von Tappeiner e Jodlbauer introduziram um novo termo, “photodynamische wirkung” (“photodynamic effect”) isto é efeito fotodinâmico. Este termo surge depois daqueles cientistas terem verificado que na destruição da *paramécia*,<sup>38</sup> na presença do corante acridina em combinação com luz visível, referida por Oscar Raab em 1900, era fundamental a presença de oxigénio. Assim, o termo para descrever o fenómeno de destruição de tecidos vivos pela combinação de fotossensibilizador, luz e oxigénio, é designado por terapia fotodinâmica (PDT).

O oxigénio, proveniente do ar e subsequentemente em “equilíbrio” no sistema vivo, é fundamental no processo de fotossensibilização, assim como a luz.<sup>36,37</sup>

O diagrama de Venn<sup>36</sup> (fig 1.5) ilustra bem a relação entre os três conceitos: fototerapia, terapia fotoquímica e terapia fotodinâmica (PDT), sendo esta última um caso particular de terapia fotoquímica.

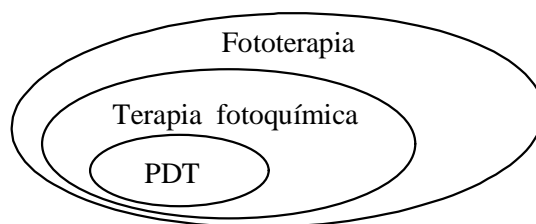
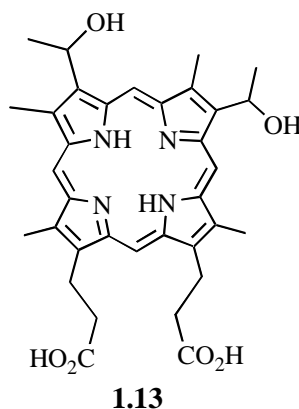


Fig. 1.5 Diagrama de Venn

### 1.5.2 Terapia fotodinâmica

Com o conceito básico definido desde os primeiros anos do séc. XX, o desenvolvimento e o interesse pela PDT sofreu avanços e recuos.

Em 1913, dez anos depois de Tappeiner e Jesionek terem usado eosina e luz solar para tratarem cancro da pele em pacientes, Meyer-Betz injectou-se com 200 mg de hematoporfirina (Hp) **1.13**. Enquanto não se expôs à luz solar não sofreu qualquer efeito nocivo, mas ao expor-se sofreu extensas queimaduras e permaneceu fotossensível por vários meses.<sup>14,36,38</sup>



Auler e Banzer verificaram a afinidade que a Hp tinha pelos tecidos neoplásicos, sendo confirmada por Figge (e outros) em 1948 através da fluorescência observada nesses tecidos devido às porfirinas acumuladas. Curiosamente essa descoberta não teve grande impacto na comunidade científica, e só uma década depois com Lipson e seus colegas, é que a PDT ressurgiu com a introdução de um derivado da hematoporfirina (HpD). Lipson demonstrou que esse derivado acumulava-se em tumores de roedores em maior quantidade do que a hematoporfirina pura.<sup>14,36</sup>

No início da década de 70 as porfirinas e em particular uma versão da hematoporfirina designada por HpD segundo estágio, começou a ser usada em ensaios clínicos, nomeadamente como agente de diagnóstico oncológico. Estes derivados da Hp foram preparados por reacção desta com uma mistura de ácido acético/ácido sulfúrico. A mistura intermédia (HpD, primeiro estágio) foi tratada em seguida com uma solução de hidróxido de sódio. Deste tratamento resultou uma mistura complexa formada por monómeros, dímeros e oligómeros, nos quais as unidades de porfirina estão ligadas por ligações éter, éster e carbono-carbono (fig. 1.6).<sup>14,38</sup>

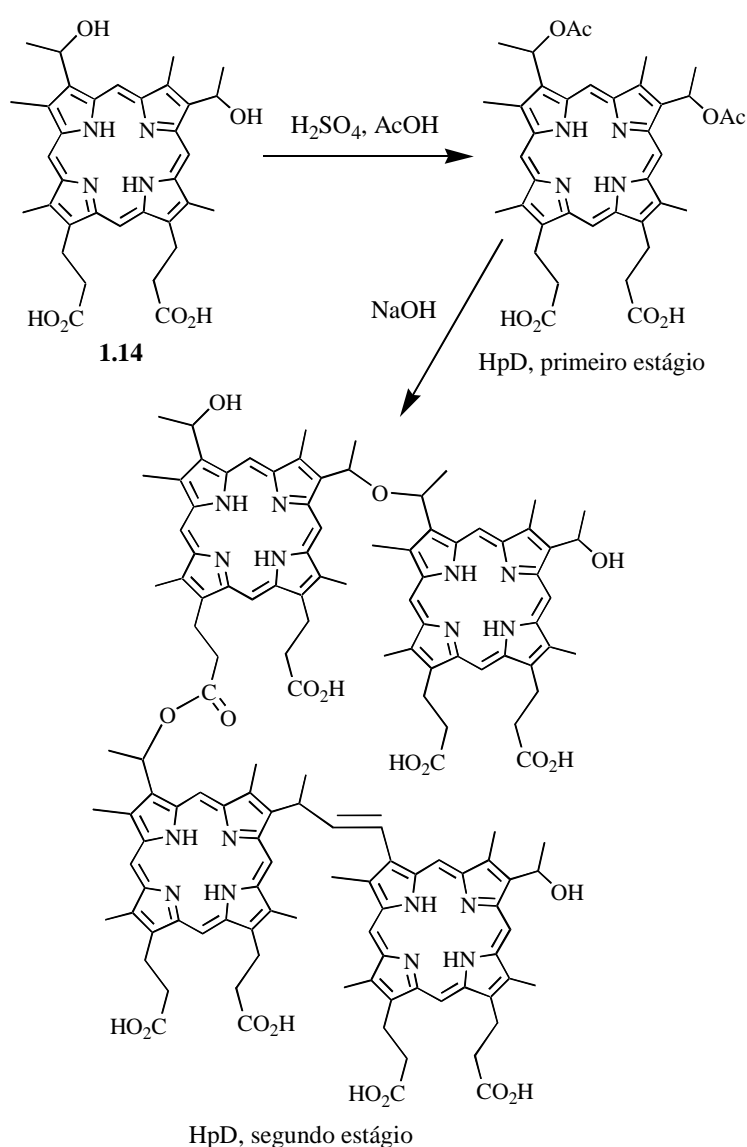
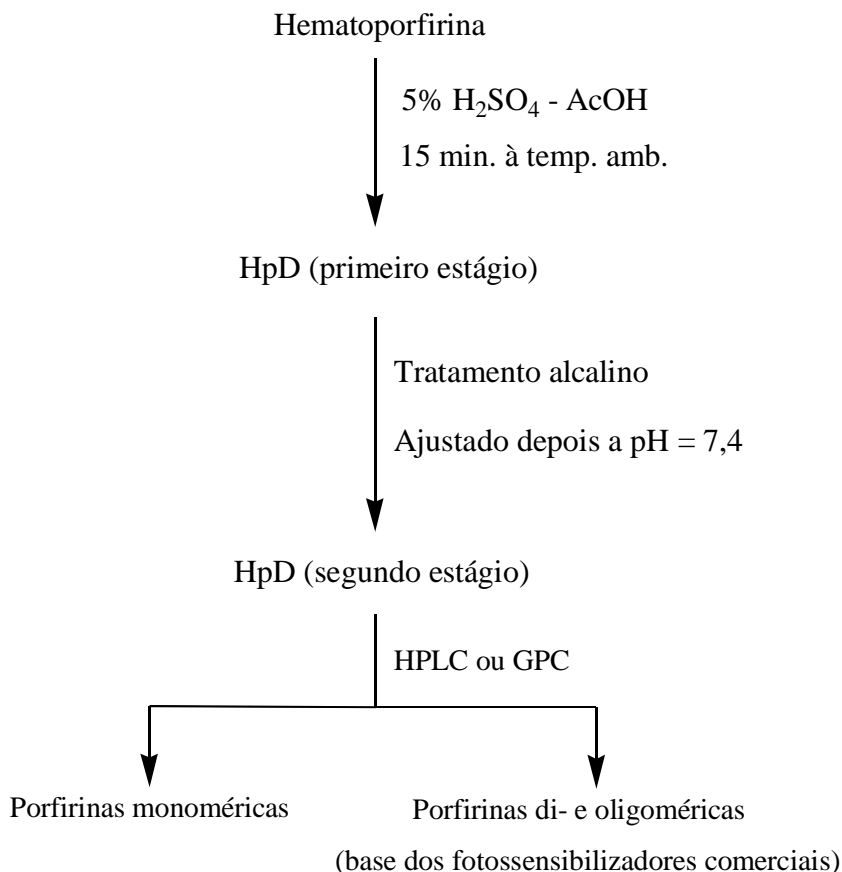


Figura 1.6 Exemplo de um tetrâmero onde são apresentadas algumas das ligações que se podem encontrar na mistura de HpD

Nos anos 80, cerca de vinte anos depois da síntese de Lipson, Dougherty purificou o HpD por ultra-filtração, removendo parte da fracção monomérica, designando a nova mistura de Photofrin II<sup>®</sup>. No final dos anos 80 os laboratórios QLT Phototherapeutics e American Cyanamid, desenvolveram um método de liofilização para a HpD purificada, obtendo a mistura comercial conhecida por Photofrin<sup>®</sup> (esquema 1.14).



Esquema 1.14<sup>39</sup>

A Photofrin<sup>®</sup> foi já aprovada em vários países, sendo usada no tratamento dos seguintes cancros:

- Canadá (cancro da bexiga e do esófago);
- Estados Unidos (cancro do esófago em estado avançado e cancro do pulmão em estado inicial);
- França e Holanda (cancro do esófago em estado inicial ou avançado)
- Japão (cancro do pulmão num estado inicial, do esófago, gástrico e cervical)

Enquanto que nos EUA a PDT já se encontra aprovada desde 1996, para o tratamento do cancro do esófago e desde 1998 para o tratamento do cancro do pulmão, em Portugal só agora começa a ser aplicada nomeadamente no Hospital da Universidade de Coimbra e no IPO de Coimbra. Actualmente, a sua implementação em Portugal depende do interesse dos directores dos institutos de oncologia por esta nova modalidade de tratamento.<sup>40</sup>

Apesar da localização preferencial da HpD nos tecidos tumorais ser conhecida desde meados do século passado, ainda não se conhece a razão para esse facto. Adiantam-se para isso vários factores como a hidrofobicidade do composto, o pH tumoral, a fraca drenagem linfática tumoral, bem como a ligação a lipoproteínas. Estes influenciam a biodistribuição e localização do fotossensibilizador nos tecidos sãos e tumorais. Outros factores possíveis para a localização incluem a agregação e a carga molecular do fotossensibilizador, bem como o potencial da membrana plasmática das células alvo.<sup>14,41</sup>

A PDT é hoje vista como uma modalidade promissora para o tratamento e diagnóstico do cancro. No entanto, aplicando o seu princípio a outras áreas, como por exemplo na fotoinactivação de microrganismos e vírus, as suas potencialidades para o futuro são ilimitadas, como se poderá verificar nesta dissertação. Neste momento, o valor da PDT em novas áreas começa a ser bastante reconhecido.

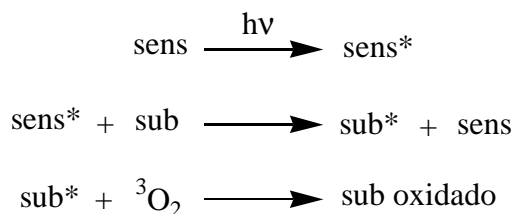
### **1.5.2.1 Mecanismo da terapia fotodinâmica**

O mecanismo da PDT foi sendo estabelecido ao longo do século XX, sendo o seu conhecimento responsável pelo grande desenvolvimento da PDT.

Nos anos 30, conhecida a dependência da presença de oxigénio e da acumulação do fotossensibilizador, para obter efeito fotodinâmico, vários foram os mecanismos propostos para o explicar. Kautsky, propôs nessa década que o fotossensibilizador excitado originava uma espécie de oxigénio activada, no entanto como a sua interpretação não teve o apoio necessário para se afirmar, foi esquecida durante anos.<sup>36</sup>

Em 1941 Blum apresentou uma explicação plausível para o processo.<sup>36</sup> Blum propôs o seguinte mecanismo para a destruição celular: o fotossensibilizador (sens) era excitado com luz de frequência adequada. O fotossensibilizador no estado excitado (sens\*) ao

interagir com um substrato (sub) tornava-o reactivo (sub\*) e capaz de reagir com oxigénio no estado de tripleto (fundamental),  $^3\text{O}_2$ . A reacção destas duas espécies dava origem ao substrato oxidado (esq. 1.15).



Esquema 1.15

Mais recentemente foi sugerido que o resultado da PDT é devido a vários processos fotoquímicos e biológicos, não fazendo sentido pensar-se em termos de um só processo para explicar o efeito fotodinâmico. Têm sido sugeridos dois processos como sendo os principais responsáveis por provocar ou promover danos nos tecidos vivos. Esses dois processos são referidos como processos do tipo I e do tipo II e encontram-se esquematizados no diagrama de Jablonski simplificado (fig. 1.7).<sup>14,36-39</sup>

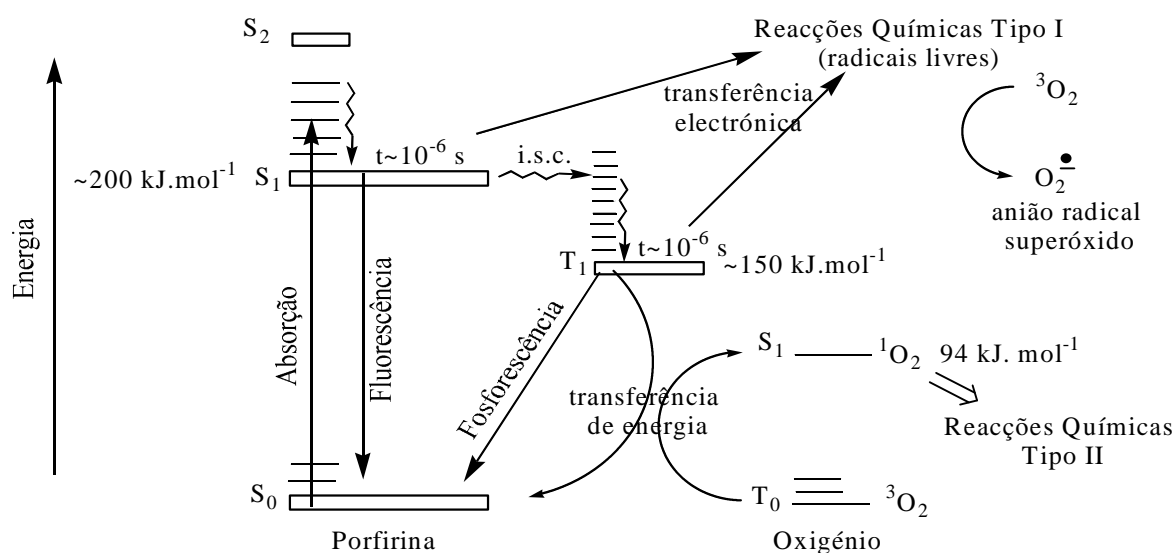


Figura 1.7<sup>39,37</sup> Diagrama de Jablonski simplificado, onde estão representados os dois processos fotofísicos principais com interesse para um fotossensibilizador tipo.

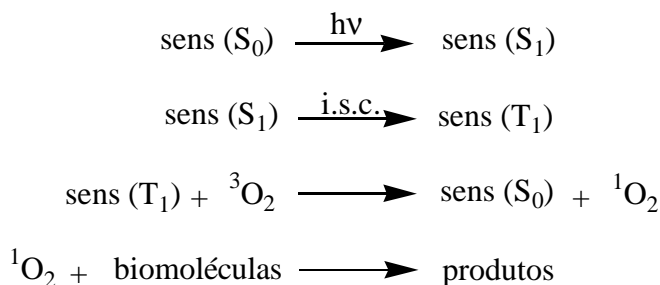
O processo de fotooxigenação de tipo II predomina sobre o de tipo I e encontra-se melhor documentado na literatura. Ambos os processos começam com a absorção de energia por parte do fotossensibilizador, que passa do estado fundamental ( $S_0$ ) a um estado de singuleto electronicamente excitado ( $S_1$ ). Neste estado excitado o fotossensibilizador pode seguir cinco vias de decaimento, sendo uma delas particularmente importante para o efeito fotodinâmico. Essa via envolve a passagem do fotossensibilizador do estado de singuleto para o estado de tripleto ( $T_1$ ) e requer a inversão de spin. Esta inversão de spin é um processo proibido designado por “intersystem crossing” (i.s.c.). Um bom fotossensibilizador é aquele que consegue percorrer o caminho proibido com alta eficiência. É a partir dos seus estados excitados que o fotossensibilizador pode originar as espécies reactivas do tipo I, ou do tipo II.

#### **a) mecanismo proposto para o processo de tipo II**

No estado de tripleto, o fotossensibilizador pode relaxar ao estado fundamental, por duas vias: uma radiativa por fosforescência, e outra não radiativa envolvendo uma troca de spin com outra molécula no estado de tripleto. A fosforescência envolve uma inversão de spin, que como já tivemos oportunidade de dizer é um processo proibido, o que confere ao estado de tripleto um tempo de vida relativamente longo, da ordem dos microsegundos. Este tempo de vida permite ao fotossensibilizador interagir com moléculas da sua vizinhança. Uma dessas moléculas pode ser o oxigénio no estado tripleto, que ao receber a energia do fotossensibilizador, por troca de spin, passa a uma espécie mais reactiva – o oxigénio singuleto ( $^1O_2$ ), enquanto o fotossensibilizador volta ao seu estado fundamental ( $S_0$ ).<sup>38</sup>

O contributo do  $^1O_2$  para o efeito fotodinâmico é ainda assunto de debate. Não obstante, a formação desta espécie tóxica é crucial para o sucesso da PDT. O  $^1O_2$  é uma espécie altamente reactiva, e apesar do seu curto tempo de vida nos sistemas biológicos, crê-se que é o agente chave dos danos causados nas células vivas sujeitas a PDT (esquema 1.16)



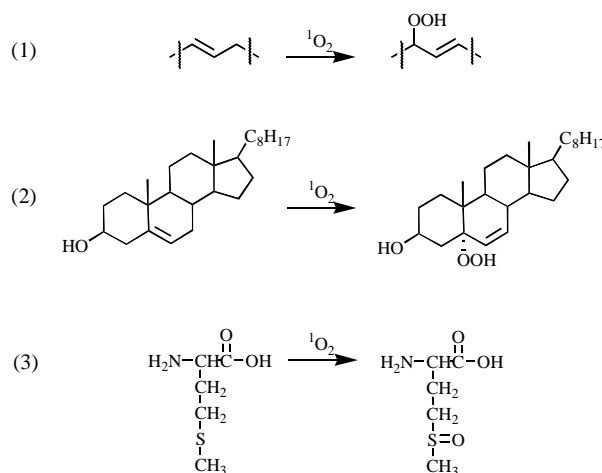


Esquema 1.16

Este esquema não é mais que uma representação do que foi postulado nos anos 30 por Kautsky, e que tem vindo a ser demonstrado como sendo o processo de tipo II.

O tempo de vida do  ${}^1\text{O}_2$  em água é de aproximadamente 1-3  $\mu\text{s}$ , enquanto no sistema celular pode variar entre os 100 ns na região lipídica das membranas e os 250 ns no citoplasma. Por esta razão a difusão do  ${}^1\text{O}_2$  é bastante limitada, sendo aproximadamente de 45 nm na membrana celular. Uma vez que o diâmetro de uma célula pode variar entre 10 e 100  $\mu\text{m}$  torna-se determinante o local onde este se forma, determinando também as estruturas celulares a que este tem acesso.<sup>14</sup>

Apesar de vários artigos apresentarem diferentes organelos subcelulares como alvos da PDT, tanto a membrana plasmática como as membranas de alguns desses organelos são consideradas como o primeiro e principal alvo da PDT. Ao provocar danos irreparáveis nestas, leva as células à morte.<sup>36</sup> O  ${}^1\text{O}_2$  reage indiscriminadamente com uma série de biomoléculas que constituem as membranas, como por exemplo: lípidos insaturados (1), colesterol (2) e  $\alpha$ -aminoácidos como o triptofano, a histidina e a metionina (3) (esquema 1.17).



Esquema 1.17

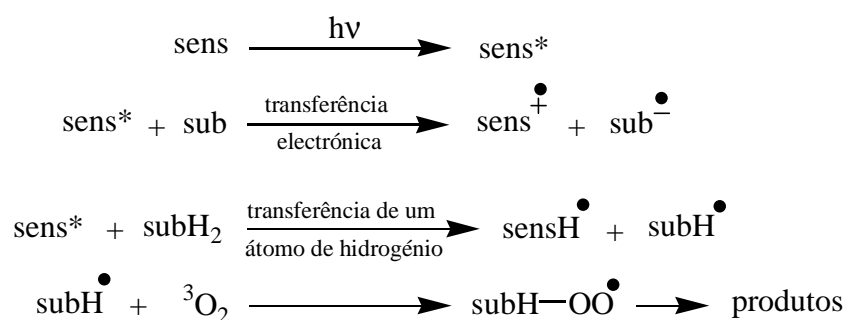
Uma vez que as membranas celulares desempenham importantes funções biológicas, como por exemplo delinear e organizar os sistemas biológicos. A sua destruição pode levar por exemplo à destruição do sistema vascular do tumor, podendo ser uma das causas da sua fotonecrose.

Julga-se mesmo que o maior mecanismo para a necrose dos tecidos tumorais com a Photofrin é provocado pelos danos causados no seu sistema vascular, evitando desta forma a irrigação do tumor com a consequente falta de oxigénio e nutrientes.

### b) mecanismo proposto para o processo de tipo I

Como já tínhamos referido, o processo de tipo II predomina sobre o de tipo I. No entanto as espécies geradas neste mecanismo contribuem também para o efeito fotodinâmico. Neste processo o fotossensibilizador no estado excitado pode gerar espécies radicais directamente com o substrato (esquema 1.18) ou com o oxigénio no estado fundamental (esquema 1.19).<sup>42</sup>

No primeiro caso o fotossensibilizador pode gerar a espécie substrato radical, por transferência de um electrão para o substrato ou por captação de um átomo de hidrogénio deste. Estas espécies activadas são capazes assim de reagir com o oxigénio no estado de tripleto.

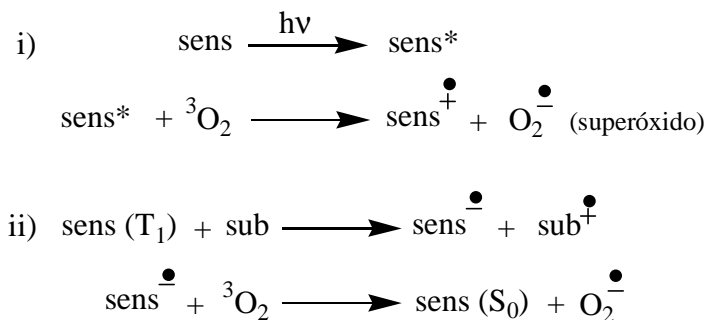


Esquema 1.18

Um dos processos biológicos que pode seguir a via radicalar é a auto-oxidação fotoquímica dos lípidos. Uma das espécies geradas fotoquimicamente, capta um átomo de hidrogénio de uma posição alílica de um lípido insaturado, originando um radical alílico.

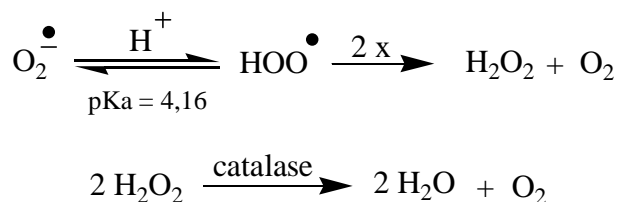
Este, por sua vez, reage com o oxigénio dando uma mistura de hidroperóxidos e os correspondentes produtos de decomposição.

No segundo caso, novamente por transferência electrónica, o fotossensibilizador transforma o oxigénio tripleto no ião radical superóxido (esquema 1.19).<sup>42</sup>



Esquema 1.19

Apesar do ião radical superóxido não ser particularmente reactivo, a sua forma protonada, o radical hidroperóxido, pode sofrer dismutação espontânea ou catalisada por superóxido dismutases, originando oxigénio e peróxido de hidrogénio. Este último, a substância tóxica, pode ser enzimaticamente destruído por catalases. No entanto quando o peróxido de hidrogénio é gerado no processo fotoquímico *in vivo* as enzimas encontram-se inactivas, não sendo por esse facto capazes de o destruir (esquema 1.20).<sup>42</sup>



Esquema 1.20

## 1.6 Referências

1. C. Manso, A. Freire, M. Azevedo, “Introdução à Bioquímica Humana”, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1986**, cap. 3, pag. 147.
2. J. A. S. Cavaleiro, K. M. Smith, *Rev. Port. Quím.*, **1989**, 31, 29.
3. Referência 1, pag. 16.
4. B. Franck, A. Nonn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 1795
5. “The Porphyrin Handbook – Applications: Past, Present and Future”, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guillard (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **2000**, vol. 6.
6. Y. R. Ortega, C. A. Toledano, D. R. Rosales, A. S. Sandoval, E. G. Vergara, R. Z. Ulloa, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1998**, 667.
7. Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda, O. Hayashida, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 721.
8. N. Solladié, A. Hamel, M. Gross, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 6075.
9. R. Purrello, S. Gurrieri, R. Lauceri, *Coordin. Chem. Rev.*, **1999**, 190, 683.
10. H. J. Tian, K. Inoue, K. Yoza, T. Ishi-I, S. Shinkai, *Chem. Lett.*, **1998**, 871.
11. V. Carré, O. Gaud, I. Sylvain, O. Bourdon, M. Spiro, J. Blais, R. Granet, P. Krausz, M. Guilloton, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1999**, 48, 57.
12. T. Ben Amor, M. Tronchin, L. Bortolotto, R. Verdiglione, G. Jori, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 67, 206.
13. L. R. Milgrom, F. O'Neill, “The Chemistry of Natural Products”, R. H. Thomson (Ed.), Blackie Academic & Professional, Londres, **1993**, cap. 8, pag. 329.
14. R. K. Pandei, G. Zheng, Referência 5, cap. 43.
15. L. R. Milgrom, “The Colours of Life”, Oxford University Press, Oxford, **1997**.
16. R. Bonnett, “Chemical Aspects of Photodynamic Therapy”, Gordon and Breach Science Publishers, Londres, **2000**, cap. 14, pag. 278.
17. J. North, H. Neyndorff, J. G. Levy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1993**, 17, 99.
18. S. A. Priola, A. Raines, W. S. Caughey, *Science*, **2000**, 287, 1503.
19. G. Jori, C. Perrin (Ed), “Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases”, Libreria Progetto Editore, Pádua, **1985**.
20. W. S. Caughey, L. D. Raymond, M. Horiuchi, B. Caughey, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1998**, 95, 12117.
21. J. B. Kim, A. D. Adler, F. R. Longo, Referência 24, cap.3.

22. “The Porphyrin Handbook – Synthesis and Organic Chemistry”, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **2000**, vol. 1.
23. “Porphyrins and Metalloporphyrins”, K. M. Smith (Ed), Elsevier Scientific Publishing Company, Amesterdão, **1975**.
24. “The Porphyrins – Structure and Synthesis, Part A”, D. Dolphin (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **1978**, vol. I.
25. “The Porphyrins – Structure and Synthesis, Part B”, D. Dolphin (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **1978**, vol. II.
26. C. H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 11427.
27. C. H. Lee, F. Li, K. Iwamoto, J. Dadok, A. A. Bothner-by, J. S. Lindsey, *Tetrahedron*, **1995**, 51, 11645.
28. J. S. Lindsey, Referência 22, cap 2.
29. A. M. d’A. R. Gonsalves, J. M. T. B. Varejão, M. M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 635
30. L. Jaquinod, Referência 22, cap. 5, pag. 230.
31. J. B. Paine III, Referência 24, cap. 4, pag. 166.
32. Q. M. Wang, D. W. Bruce, *Synlett*, **1995**, 1267.
33. K. M. Smith, Referência 23, cap. 1.
34. T. R. Janson, J. J. Katz, “The Porphyrins – Physical Chemistry, Part B”, D. Dolphin (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **1979**, vol. IV, cap. 1.
35. M. G. H. Vicente, Referência 22, cap. 4.
36. R. Bonnett, *Rev. Contemp. Pharmacother*, **1999**, 10, 1.
37. R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, 24, 19.
38. E. D. Sternberg, D. Dolphin, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151.
39. Referência 16, pag. 117.
40. Página da internet: <http://www.cienciaviva.mct.pt/healthXXI/qtflores/lab.asp>
41. R. W. Boyle, D. Dolphin, *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 64, 469.
42. Referência 16, Cap.4.

## **Capítulo II**

### **Síntese e estudos fotobactericidas de porfirinas ligadas a polilisina**



## 2.1 Introdução

Doenças de origem microbiana e viral foram responsáveis pela perda de muitas vidas, antes da introdução da penicilina. Apesar da acção bactericida da penicilina ser conhecida desde 1927 por Alexander Fleming, somente durante a 2ª Guerra Mundial é que o seu valor foi reconhecido devido à urgente necessidade de curar as infecções em feridos. A confiança em antibióticos no combate a infecções tornou-os largamente utilizados. Mas se durante os primeiros tempos não se observou o desenvolvimento de estirpes resistentes, com a ampla utilização dos antibióticos proporcionou-se o desenvolvimento de estirpes bacterianas e fúngicas resistentes aos actuais antibióticos.<sup>1</sup> Agentes patogénicos resistentes começam a causar sérios problemas, especialmente entre infecções adquiridas em hospitais, e em pessoas de risco como as crianças, velhos e doentes imunossuprimidos. “O fim da era dos antibióticos” título de um artigo publicado recentemente na imprensa portuguesa,<sup>2</sup> alerta para o facto de as bactérias estarem cada vez mais resistentes aos actuais antibióticos. É de realçar que os antibióticos destroem as bactérias sensíveis, mas não exercem qualquer efeito sobre as resistentes, que aproveitam para se multiplicar rapidamente. Tais factos apontam para a necessidade de se desenvolverem novas modalidades terapêuticas aceites alargadamente, para o combate aos microrganismos patogénicos.

Como tivemos oportunidade de descrever no primeiro capítulo, a PDT baseia-se no facto de certos compostos fotoexcitáveis ao localizarem-se preferencialmente em certos tecidos vivos, e subsequentemente activados por luz com um comprimento de onda apropriado geram espécies citotóxicas para as células do tecido alvo. Dessa forma a PDT é hoje encarada como uma modalidade promissora no tratamento e diagnóstico do cancro e o seu princípio está a ser aplicado a muitas outras áreas,<sup>3</sup> nomeadamente na inactivação ou eliminação de microrganismos<sup>4,5</sup> (bactérias,<sup>6</sup> fungos,<sup>7</sup> e protozoários<sup>8</sup>), vírus<sup>9</sup> e priões,<sup>10</sup> em fluídos ou materiais contaminados e em infecções por agentes patogénicos.<sup>4,11</sup>

Vários trabalhos têm mostrado que muitos microrganismos podem ser inactivados por irradiação com luz na presença de corantes fotossensibilizadores.<sup>7</sup> Mostram ainda que no caso das bactérias, as Gram-positivas são mais susceptíveis à fotoinactivação, do que as Gram-negativas. Tal facto, advém da menor permeabilidade das membranas nos



organismos Gram-negativos<sup>4</sup>. No entanto, algumas destas bactérias têm sido fotoinativadas, utilizando para isso substâncias que modifiquem a permeabilidade da membrana exterior, permitindo a passagem do fotossensibilizador para o interior da célula ou que permitam uma maior ligação à membrana celular.<sup>6,12</sup> No caso de bactérias Gram-negativas, torna-se assim fundamental elaborar uma estratégia para que o fotossensibilizador se acumule nas células, pois como já foi referido as membranas externas destas são muito menos permeáveis do que as de organismos Gram-positivos e são portanto uma forte barreira à penetração do fotossensibilizador a locais intracelulares sensíveis.

As representações esquemáticas, apresentadas na fig. 2.1 e a sua breve descrição, permite compreender melhor a grande diferença entre os dois tipos de células bacterianas e a sua classificação de Gram.

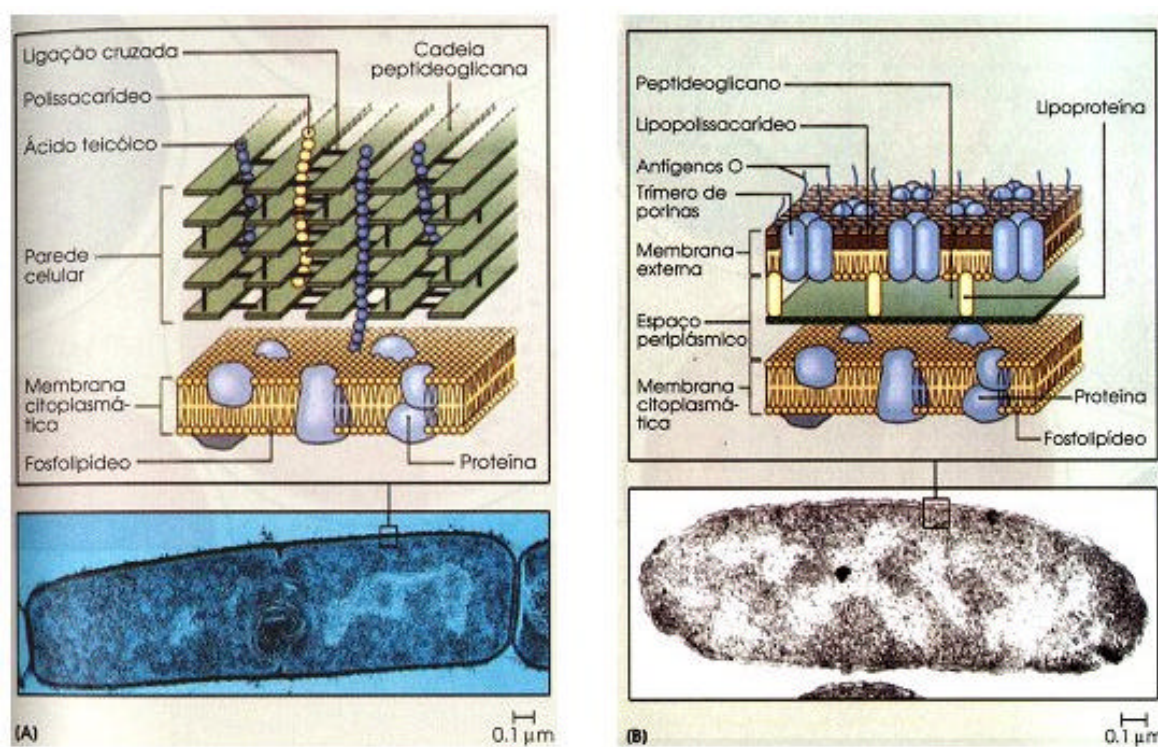


Figura 2.1<sup>13</sup> Representação esquemática da estrutura da parede celular de uma bactéria Gram-positiva [A] e de uma bactéria Gram-negativa [B].

O que realmente distingue estas células são as suas paredes celulares, estruturas rígidas que mantêm a forma característica das células bacterianas, em grande parte devido essencialmente a um dos seus constituintes – o peptidoglicano - polímero poroso e

insolúvel, de grande resistência, encontrado somente em células procariotas. Da análise da representação das duas membranas pode-se constatar a existência de uma menor quantidade deste polímero nas Gram-negativas e a sua diferente posição na membrana. Enquanto que nas Gram-positivas este posiciona-se na parte exterior da parede, nas Gram-negativas ele ocupa o espaço periplasmático, entre a membrana citoplasmática e a membrana externa.

Apesar de outras diferenças, é a membrana externa que distingue as bactérias Gram-negativas das Gram-positivas. Uma membrana típica de fosfolípidos em bicamada, constituída ainda por proteínas e lipopolissacarídeos. Embora seja uma barreira à passagem de substâncias grandes, tais como proteínas, para o interior e exterior da célula, é permeável a moléculas menores como peptídeos e polissacarídeos. Além da sua selectividade para compostos com base no seu peso molecular, apresenta também permeabilidade selectiva com base na sua carga eléctrica.

A classificação das bactérias em dois grupos, Gram-positivas e Gram-negativas, foi proposta em 1884 por Christian Gram, que desenvolveu uma técnica de coloração diferencial para bactérias – Coloração de Gram. Neste processo as bactérias são tratadas com violeta de cristal e em seguida com uma solução de iodo, formando deste modo o complexo violeta de cristal-iodo. Quando as bactérias são tratadas com etanol a membrana externa das Gram-negativas é destruída, aumentando a permeabilidade da parede celular destas bactérias.

Desta forma temos: as bactérias Gram-positivas, que retêm o complexo violeta de cristal-iodo, no interior da célula, e aparecem coradas de violeta-escuro; e as bactérias Gram-negativas, que perdem o corante quando tratadas com álcool. Estas, no entanto, podem ser, depois, tratadas com safranina e aparecerem coradas de vermelho.<sup>14</sup>

Estudos efectuados com várias porfirinas *meso*-substituídas e ftalocianinas com diferentes cargas, mostraram que ao contrário dos fotossensibilizadores aniónicos e neutros, os carregados positivamente inibiam tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.<sup>15</sup> A presença de pelo menos uma carga positiva no fotossensibilizador parece ser necessária para induzir uma diminuição significativa na sobrevivência das bactérias Gram-negativas, independentemente da estrutura química do composto.<sup>7</sup> Também tem sido sugerido que a assimetria na distribuição das cargas pode explicar a

grande acumulação de fotossensibilizadores catiónicos nas células alvo.<sup>16</sup> A aparente capacidade destes fotossensibilizadores induzirem uma drástica diminuição na sobrevivência das bactérias Gram-negativas, usando o mesmo protocolo de fotoinativação das Gram-positivas, abriu novas e interessantes perspectivas para a utilização de fotossensibilizadores, por exemplo, no tratamento de infecções bacterianas e na fotoesterilização de águas e de fluídos orgânicos contaminados.<sup>7,15</sup>

Uma vez que alguns fotossensibilizadores usados em PDT têm selectividade limitada, vários grupos de síntese têm procurado incrementar a especificidade dessas moléculas para o alvo considerado. Por exemplo, porfirinas ligadas covalentemente a açúcares e a aminoácidos têm sido descritas como exibindo grande afinidade para células cancerígenas e uma actividade fotossensibilizadora bastante eficiente.<sup>17,18</sup> Foi igualmente referido que porfirinas catiónicas ligadas a unidades glicosídicas, com características anfifílicas, penetram mais facilmente nas membranas celulares.<sup>19</sup>

Mais recentemente, porfirinas ligadas a polímeros, naturais ou sintéticos, foram descritas como capazes de transportar e “entregar” eficazmente o fotossensibilizador a células tumorais,<sup>16</sup> e a ambos os tipos de bactérias,<sup>6</sup> permitindo assim uma maior eficácia da PDT. Estes polímeros podem apresentar várias cargas positivas ou negativas, e os efeitos destas têm vindo a ser estudados.<sup>16</sup> Estes resultados sugeriram que a polilisina poderia ser uma boa alternativa para realizar o transporte do fotossensibilizador de uma forma eficaz, permitindo deste modo, não só, uma maior acumulação na superfície da membrana externa das bactérias Gram-negativas, mas também perturbar, suficientemente, a barreira de peptidoglicano tornando-a mais permeável ao fotossensibilizador.

Já durante a elaboração desta tese surgiram duas comunicações em congressos que apresentavam a acção de conjugados da clorina e6 ( $c_{e6}$ ) com vários polipeptídeos de lisina (policatiónicos) sobre bactérias dos dois tipos de Gram. Os resultados obtidos *in vitro*,<sup>20</sup> e *in vivo*<sup>21</sup> foram considerados bastante promissores e justificados em parte pela acumulação destas drogas poliméricas nas células. Esta ocorre por ligação à membrana e/ou por endocitose, visto que a difusão passiva por entre a membrana plasmática não é possível devido ao tamanho das moléculas.

Assim, a possibilidade de usar fotossensibilizadores (porfirínicos ou outros) como agentes selectivos no tratamento de doenças causadas por microrganismos pode ser considerada uma boa alternativa ao uso de novos agentes antimicrobianos. Para isso, os

fotossensibilizadores devem satisfazer vários requisitos ao serem usados em estudos de PDT.<sup>3,22,23</sup> No entanto, na PDT de microrganismos devem destacar-se os seguintes:

- a) apresentarem a mínima toxicidade na ausência de luz;
- b) serem selectivos para os “alvos” considerados;
- c) apresentarem uma significativa absorção na região do visível do espectro electromagnético (não é tão importante a sua absorvência a comprimentos de onda próximos do infravermelho, como no caso da PDT de tecidos neoplásicos);
- d) apresentarem rendimentos quânticos elevados dos seus estados de tripleto e de formação de oxigénio singuleto;
- e) em baixas concentrações devem apresentar amplo espectro de acção – inibir ou destruir muitos microrganismos patogénicos diferentes;
- f) terem solubilidade apreciável em meios fisiológicos;
- g) se possível de baixo custo.

Como já tivemos oportunidade de dizer várias vezes, algumas porfirinas são óptimos fotossensibilizadores, e em seguida descreve-se a metodologia utilizada para sintetizar porfirinas ligadas à polilisina e por último os resultados obtidos em estudos bacteriológicos.

## 2.2 Síntese de porfirinas ligadas a polilisina

No capítulo anterior tivemos a oportunidade de descrever algumas rotas de síntese de determinados macrociclos porfirínicos bem como apresentar uma das aplicações mais importantes em que estes podem ser utilizados, a PDT.

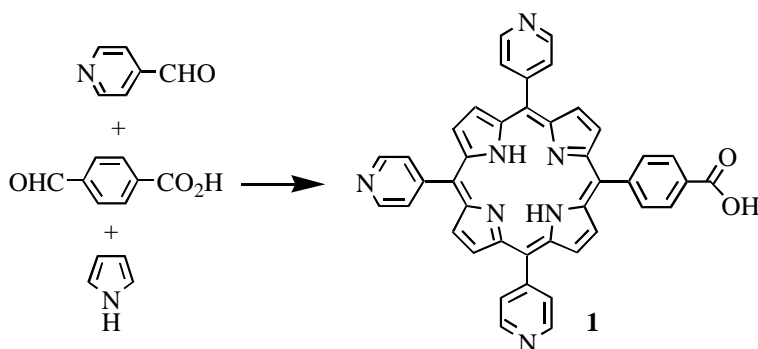
Neste subcapítulo, sabendo da grande resistência das bactérias Gram-negativas à fotoinactivação, em grande parte devido à membrana externa destas, apresentamos a síntese das porfirinas 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (**1**) e do triiodeto de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (**11**) e o método do seu acoplamento a polilisina (as formas poliméricas de lisina que usamos, constituem uma mistura de massas moleculares de 1 a 4 KD, sendo esta mistura designada neste trabalho por polilisina). Este método envolveu reacções típicas, tanto das porfirinas como de

peptídeos e para a optimização das condições utilizaram-se, como modelos, aminoácidos simples como a lisina e o éster de metilo da glicina.

### 2.2.1 Síntese de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina

Para realizar o trabalho proposto, foi necessário sintetizar a porfirina precursora **1**. Esta porfirina, possuindo três grupos piridilo e um grupo fenilo com uma função ácido carboxílico, foi preparada por condensação de pirrol com aldeídos adequados, usando as vias de síntese apresentadas nos esquemas 2.1 (síntese directa) e 2.2 (síntese a partir da hidrólise do éster metílico correspondente **2**).

A porfirina **1** foi preparada por condensação de pirrol com piridina-4-carbaldeído e ácido 4-formilbenzóico, em proporções relativas que favoreceram a formação do macrociclo desejado (esquema 2.1). A condensação foi levada a cabo numa mistura de ácido acético glacial/nitrobenzeno em refluxo. Ao fim de cerca de uma hora a reacção considerou-se terminada, procedendo-se de seguida à destilação, a pressão reduzida, da mistura dos solventes até à secura. O resíduo foi sujeito a cromatografia rápida de coluna tendo-se obtido uma primeira fracção que foi identificada como sendo a 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina com um rendimento de 3%. A segunda fracção isolada, com um rendimento de 6%, foi identificada como sendo a porfirina **1**.

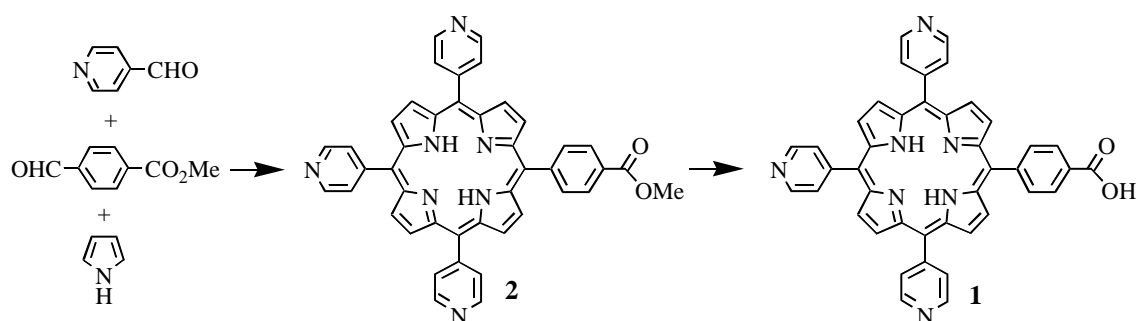


Esquema 2.1

O composto **1** foi caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$ , análise elementar e por espectroscopia de visível.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  teve de ser feito na mistura  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  devido à baixa solubilidade do produto em vários solvente, inclusive nos dois que constituem a mistura. Todos os sinais surgem na zona aromática, donde destacamos um multiplete largo a  $\delta$  8,65-8,91 ppm correspondente à ressonância dos prótons *meta* dos grupos piridilo (10 e 20) e dos prótons  $\beta$ -pirrólicos, um duplete ( $J= 5,7$  Hz) a  $\delta$  9,02 ppm correspondente à ressonância dos prótons *meta* do grupo piridilo da posição 15. A ressonância dos prótons *orto* e *meta* do grupo fenilo, surgem sob a forma de um duplete, respectivamente a  $\delta$  8,28 e 8,50 ppm ( $J= 7,8$  Hz), e os restantes prótons *orto* dos grupos piridilo surgem a  $\delta$  8,12 e 8,25 ppm, também sob a forma de dupletos. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podemos confirmar a presença de grupo carboxilo a  $\delta$  169,2 ppm. O espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta um pico correspondente ao ião de massa a  $m/z$  662 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ . Por último, a espectroscopia de visível apresentou-nos um espectro do tipo *phyllo*.

Numa tentativa para melhorar o rendimento de **1**, a síntese de Rothemund foi realizada em condições idênticas às descritas anteriormente, mas usando o 4-formilbenzoato de metilo, em vez do ácido 4-formilbenzóico (esquema 2.2).



Esquema 2.2

A mistura reaccional foi cromatografada em coluna de sílica, obtendo-se duas fracções. A fracção mais polar foi sujeita a cromatografia rápida em coluna tendo sido isolada a 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina (0.5%) e a porfirina pretendida **2** (4%). Na fracção menos polar foram separadas e identificadas as outras porfirinas, também formadas nesta reacção. A porfirina menos polar foi identificada como sendo a 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxicarbonilfenil)porfirina (1%), seguida da 5,10,15-tris(4-metoxicarbonilfenil)-20-(4-piridil)porfirina (5%). As duas últimas correspondiam a um

par de isómeros: 5,15-bis(4-metoxycarbonilfenil)-10,20-di(4-piridil)porfirina (2%), e 5,10-bis(4-metoxycarbonilfenil)-15,20-di(4-piridil)porfirina (5%).

O composto **2** foi caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$  cujo espectro apresenta um pico a  $m/z$  de 676 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi obtido em  $\text{CDCl}_3$ , com o produto **2** a mostrar uma maior solubilidade que o composto **1**, dando desse modo um espectro com sinais muito melhor definidos. Neste caso já surge o sinal mais característico das porfirinas não complexadas, o singuleto que aparece entre  $\delta$  -2 e -3 ppm, atribuído aos dois prótons NH que se encontram no interior do macrociclo, que neste caso surge a  $\delta$  -2,90 ppm. A  $\delta$  4,12 ppm surge um sinal sob a forma de singuleto correspondente à ressonância dos três prótons do metilo do grupo éster. Relativamente à zona aromática do espectro cabe realçar um duplete a  $\delta$  8,17 ppm correspondente à ressonância dos seis prótons *orto* dos grupos piridilo, um multiplete correspondente à dos prótons  $\beta$ -pirrólicos entre  $\delta$  8,84 e 8,87 ppm e um outro correspondente à dos seis prótons *meta* dos grupos piridilo entre  $\delta$  9,05 e 9,07 ppm. A ressonância dos prótons *orto* e *meta* do grupo fenilo substituído aparecem, como na porfirina anterior, sob a forma de dupletos ( $J= 8,3$  Hz) a  $\delta$  8,30 e 8,47 ppm, respectivamente.

A hidrólise do éster **2** foi realizada em THF e piridina, por tratamento com hidróxido de potássio dissolvido em metanol. Ao fim de três horas a 60 °C verificou-se por TLC que todo o éster de partida tinha sido hidrolisado. A fase orgânica foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico e a porfirina **1** obtida por cristalização com um rendimento de 94%.

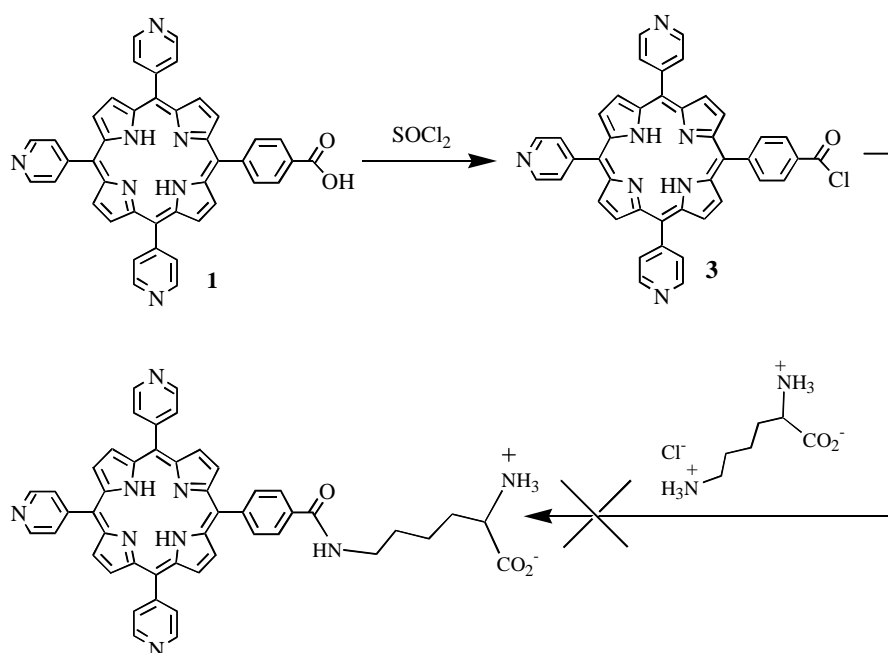
Apesar da hidrólise ter decorrido da melhor forma, verificou-se que a síntese de **2** não trouxe nenhuma melhoria para a obtenção de **1**. Além do rendimento de **2** ter sido inferior ao da porfirina **1** obtida directamente, a sua purificação foi muito mais complicada e dispendiosa. Assim, optámos pela primeira via para a síntese da porfirina **1**.

## 2.2.2 Estudos de optimização das condições de acoplamento

### 2.2.2.1 Activação do grupo carboxílico

Uma vez que o objectivo era ligar a porfirina **1** a terminais amino da polilisina, o processo de acoplamento a esses terminais foi primeiro optimizado, estudando-se para isso vários métodos e procedimentos com os aminoácidos lisina e os ésteres de metilo da lisina e da glicina, como já foi referido anteriormente. Partindo directamente para a polilisina, além de ser altamente dispendioso, seria também mais difícil o estudo das condições ideais, dado tratar-se de um polímero. Assim, três métodos diferentes foram testados:

a) O primeiro envolveu a transformação do grupo ácido da porfirina **1** em cloreto de acilo, usando para o efeito cloreto de tionilo<sup>24</sup> (esquema 2.3).



Esquema 2.3

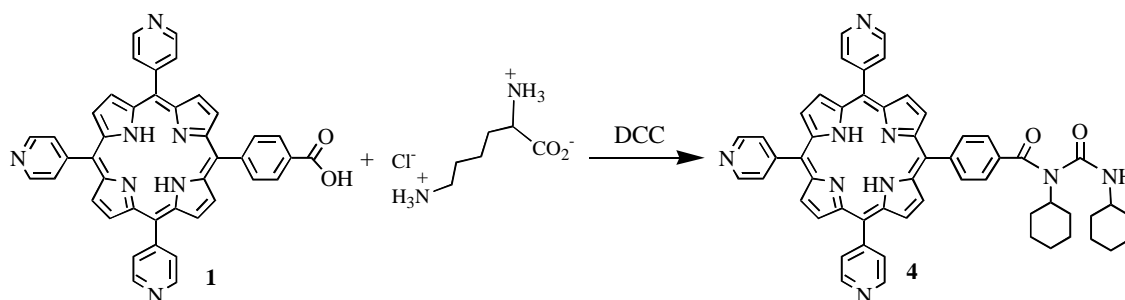
O cloreto de acilo **3** foi facilmente gerado em piridina seca e a sua presença foi confirmada por adição de metanol seco a pequenas alíquotas retiradas da mistura reaccional. Assim, a formação do cloreto de acilo foi facilmente seguida por TLC, com a formação do éster metílico respectivo. Apesar de se gerar muito bem a porfirina **3** em



piridina, ao adicionar a lisina verificou-se que esta não reagia, provavelmente devido à sua baixa solubilidade nestas condições.

Uma vez que a lisina e a polilisina eram solúveis em DMSO, tentou-se gerar o composto **3** com  $\text{SOCl}_2$  e com  $\text{POCl}_3$  em DMSO seco. Verificou-se no entanto que o  $\text{SOCl}_2$  e o  $\text{POCl}_3$  reagem com o solvente, o que nos levou a abandonar este método.<sup>25</sup>

**b)** Numa segunda abordagem usou-se a *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida<sup>26,27</sup> (DCC) como agente de acoplamento, na presença de 4-pirrolidinopiridina<sup>27</sup> em DMSO. Nestas condições obteve-se um composto que foi identificado por RMN de  $^1\text{H}$  e espectrometria de massa como sendo o composto **4** (esquema 2.4). Este género de compostos surgem em maior ou menor quantidade nestas reacções, consoante a aptidão que o nucleófilo apresenta para a substituição e que a *O*-acilureia intermediária apresenta, nas mesmas condições, em sofrer substituição pelo composto a acoplar ou originar por rearranjo a *N*-acilureia.<sup>28</sup>



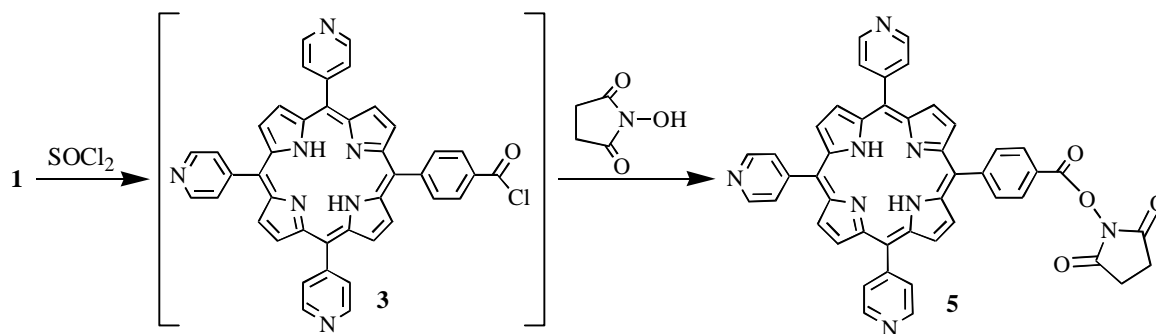
Esquema 2.4

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4** apresenta na zona alifática um sinal em forma de multipeto entre  $\delta$  1,15 e 2,18 ppm correspondente à ressonância dos vinte prótons metilénicos dos anéis de ciclo-hexano. A  $\delta$  3,65-3,78 e 4,37-4,45 ppm surgem dois multipletos correspondentes à ressonância dos prótons metínicos, também dos anéis do ciclo-hexano. Deve-se ainda realçar o sinal correspondente à ressonância do próton que se encontra ligado ao azoto da ureia, que surge sob a forma de um dupeto ( $J= 7,5$  Hz) a  $\delta$  6,27 ppm. Relativamente à zona aromática do espectro houve pequenas alterações nos desvios químicos, mas sem qualquer modificação no tipo de sinais apresentados pela

porfirina. O espectro de massa com um pico a  $m/z$  868 ( $M+H$ )<sup>+</sup> confirma a estrutura proposta.

c) Finalmente decidimos activar a função ácido com *N*-hidroxi-succinimida (esquema 2.5). As reacções de acoplamento do derivado **5** com os aminoácidos e a polilisina ocorreram em condições muito suaves, e com excelentes rendimentos ( $\eta > 90\%$ ).

Para preparar o composto **5** começou-se por gerar o cloreto de acilo **3** com  $\text{SOCl}_2$  em piridina seca, como já tinha sido referido anteriormente, adicionando-se em seguida *N*-hidroxi-succinimida. Ao fim de três horas verificou-se por TLC que a porfirina **1** tinha sido totalmente consumida. O éster puro foi obtido por cristalização, depois de evaporada a piridina, com um rendimento de 91%.



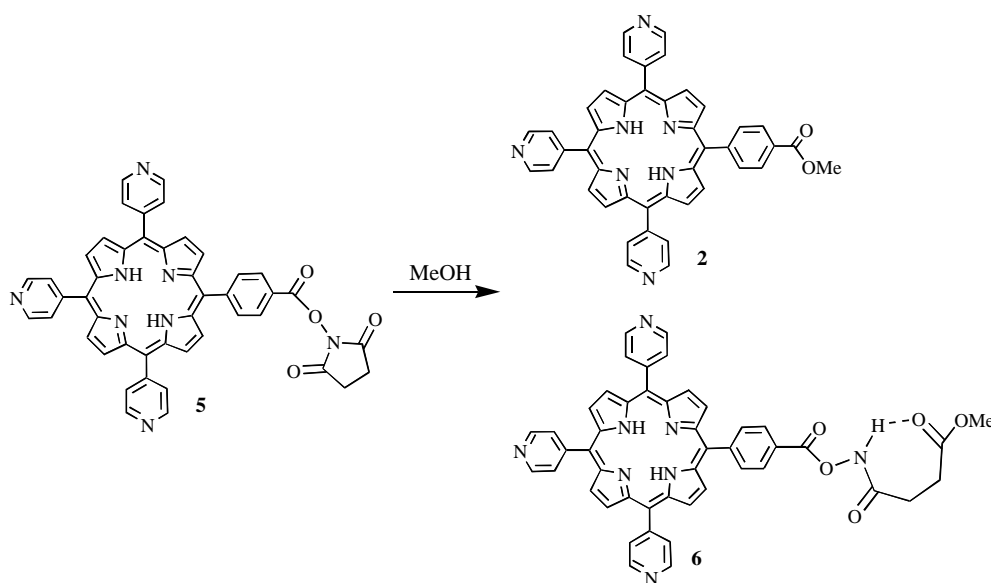
Esquema 2.5

A caracterização do composto **5** foi realizada recorrendo à espectrometria de massa ( $\text{FAB}^+$   $m/z$ : 759 ( $M+H$ )<sup>+</sup>) e à espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pode ver-se, claramente, um singuleto largo a  $\delta$  3,03 ppm correspondente à ressonância dos quatro prótons do grupo imida. A zona aromática do espectro deste composto é análoga à do éster de metilo **2** da mesma porfirina. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  confirma a presença de carbonos alifáticos; um sinal a  $\delta$  25,7 ppm corresponde à ressonância dos dois carbonos do grupo imida. Para valores de frequência bem maiores temos dois outros sinais que merecem toda a atenção, um a  $\delta$  161,9 ppm correspondente à ressonância do grupo carbonilo ( $\text{COON}$ ) e outro a  $\delta$  169,3 ppm correspondente à ressonância dos dois grupos carbonilo ( $\text{CON}$ ) do grupo imida.

O composto **5** foi ainda sintetizado, em DMSO, usando como agente de acoplamento a DCC. Ao fim de vinte e quatro horas a 40 °C verificou-se por TLC que a porfirimina **1** tinha sido totalmente consumida, dando origem a dois novos compostos. O mais polar foi identificado como sendo o produto da adição da DCC ao ácido, a *N*-acilureia (**4**), e o menos polar como sendo o composto pretendido **5**. Este último, foi obtido com um rendimento de 54%, bastante inferior ao método anterior onde se usou o SOCl<sub>2</sub> para gerar o intermediário **3**.

Deve-se mencionar que nas reacções com o éster activado **5** não se pode usar metanol, uma vez que este reage facilmente com o cloreto de acilo e com o éster da *N*-hidroxi-succinimida, originando as porfirinas **2** e **6** (esquema 2.6). Estes dois derivados foram obtidos durante os processos de extracção e purificação do produto **5**, quando se utilizou metanol.



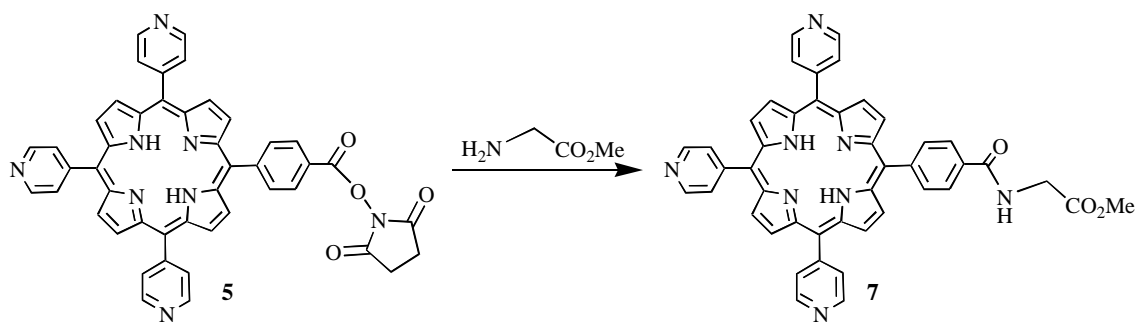
Esquema 2.6

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **6** observou-se o singuleto característico dos prótons NH internos a δ -2,89 ppm, seguido de um multiplete correspondente à ressonância dos quatro prótons metilénicos, e logo a seguir um singuleto devido à ressonância dos prótons do grupo metoxilo. Mais uma vez a zona aromática do espectro é idêntica à das porfirinas anteriores. O espectro de próton apresenta ainda um sinal largo a

$\delta$  11,0 ppm, atribuído ao próton ONHCO. A elevada frequência a que se encontra este sinal indica provavelmente que o próton está envolvido numa ligação de hidrogénio intramolecular. O espectro de massa apresenta um pico a  $m/z$  791 correspondente ao ião  $(M+H)^+$ .

#### 2.2.2.2 Acoplamento da porfirina activada **5** ao éster metílico da glicina e à lisina

Antes de se fazer reagir o éster activado **5** com a lisina fez-se a reacção com o éster metílico da glicina em DMSO seco, à temperatura ambiente. Verificou-se por TLC que a reacção tinha sido completa, ao fim de dezasseis horas. O produto **7** foi obtido directamente por cristalização com um rendimento de 96% (esquema 2.7).



Esquema 2.7

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  confirma a estrutura do produto **7**, uma vez que os sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons da glicina surgem com a multiplicidade e desvios químicos esperados. A  $\delta$  3,91 ppm surge o singuleto correspondente à ressonância dos prótons do grupo metoxilo, a  $\delta$  4,46 ppm surge o duplete ( $J = 4,8$  Hz) correspondente à ressonância dos dois prótons metilénicos e a  $\delta$  7,06 ppm o tripleto ( $J = 4,8$  Hz) correspondente à ressonância do próton do grupo amida. A estrutura foi ainda confirmada por espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$  com um pico a  $m/z$  733  $(M+H)^+$ .

Uma vez que a reacção da porfirina **5** com o éster de metilo da glicina foi bem sucedida, aplicamos o mesmo procedimento para o acoplamento da porfirina com a lisina, usando como base a trietilamina. A reacção decorreu durante vinte horas à temperatura

ambiente e sob atmosfera de azoto. Por TLC verificou-se a presença de duas manchas, uma maioritária (maior  $R_f$ ) e uma minoritária (menor  $R_f$ ). De início pensámos tratar-se dos isómeros **8** e **9** (figura 2.1).

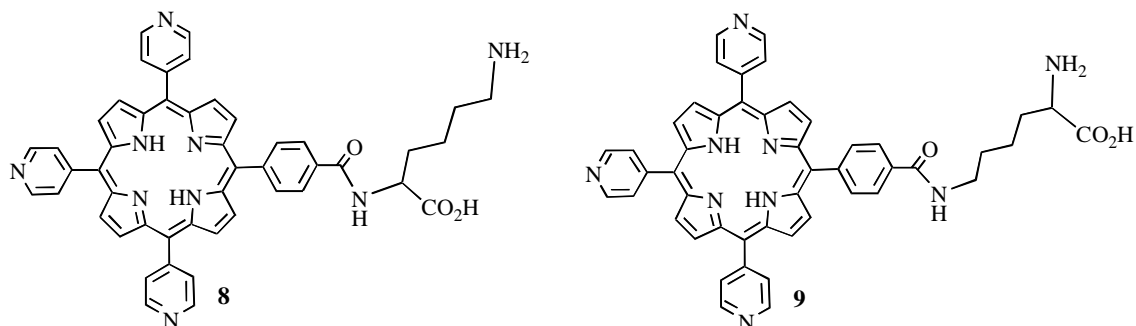
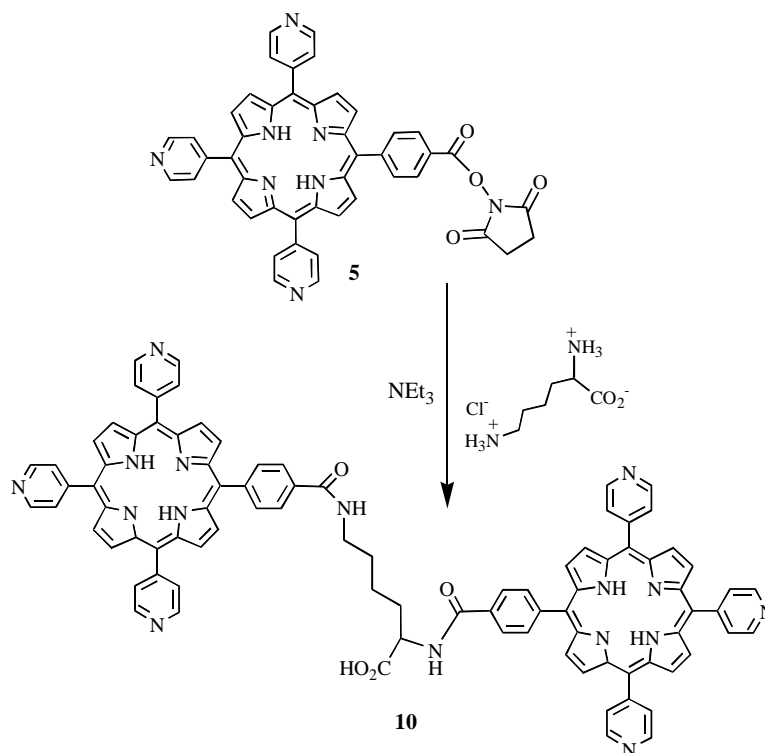


Figura 2.1 Estruturas dos isómeros esperados, do acoplamento entre a porfirina **5** e a lisina.

Terminada a reacção, o DMSO foi removido a pressão reduzida, e o resíduo, depois de retomado numa mistura clorofórmio/metanol e lavado com água, foi cromatografado em coluna de sílica gel. A fracção principal (95%) foi eluída com clorofórmio/metanol. Não foi possível caracterizar a fracção mais polar, em grande parte devido à sua baixa solubilidade e à sua grande polaridade.

Depois da caracterização do produto principal por RMN de  $^1\text{H}$ , verificámos, com espanto, que não estávamos perante nenhum dos isómeros esperados, mas sim do dímero **10**, apesar de se ter usado 2,6 equivalentes de lisina relativamente à porfirina (esquema 2.8).



Esquema 2.8

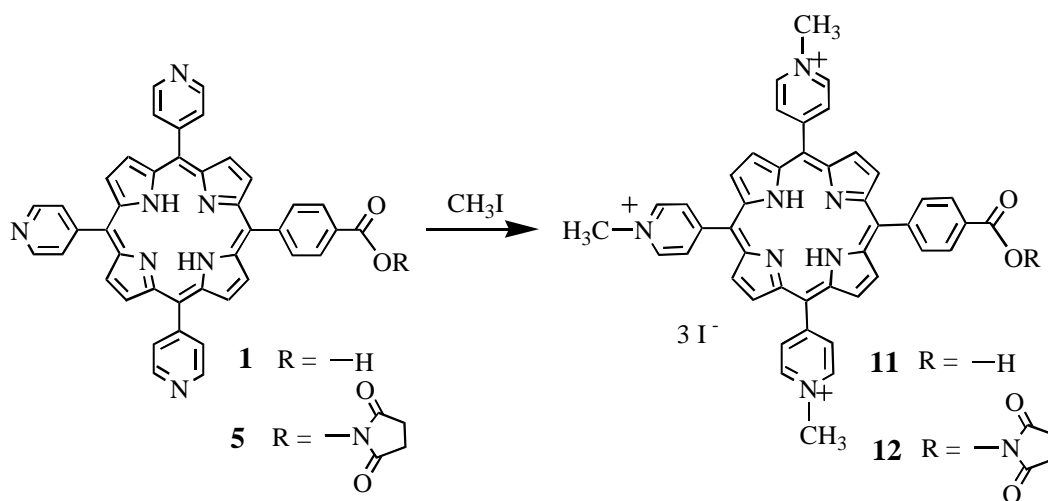
A estrutura do dímero **10** foi proposta após análise dos espectros de RMN de próton e massa. O RMN de  $^1\text{H}$  foi feito na mistura  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , e apesar de não ter sido possível assinalar todos os prótons do dímero **10** no espectro, constatou-se que estávamos perante um dímero, uma vez que o número de prótons aromáticos era o dobro dos prótons esperados para uma das espécies monoméricas. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta na zona aromática um multipeto a  $\delta$  7,65-7,72 ppm com um integral correspondente a oito prótons, que em princípio correspondem à ressonância dos prótons dos dois grupos fenilo substituídos, das duas porfirinas. Ainda na zona aromática surge um multipeto a  $\delta$  8,16-9,01 ppm, integrando para quarenta e dois prótons, correspondentes aos restantes prótons dos dois macrociclos e dos dois prótons dos grupos amida. Na parte alifática do espectro surgem vários multipetos correspondentes à ressonância dos oito prótons metilénicos da lisina. A  $\delta$  4,90 ppm surge um sinal sob a forma de um singuleto largo devido à ressonância do próton metínico do aminoácido. A  $\delta$  -3,03 ppm surge um singuleto correspondente à ressonância dos quatro prótons internos (NH) das duas porfirinas.

Esta estrutura foi confirmada, de uma forma inequívoca, por espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$  que revelou um pico a  $m/z$  1433 ( $\text{M}+2\text{H}$ ) $^+$ .

### 2.2.3 Metilação dos compostos **1**, **5** e do dímero **10**

Sabendo que um dos requisitos dos fotossensibilizadores para PDT de microrganismos é a solubilidade em meios fisiológicos, como já foi referido, as porfirinas **1**, **5** e **10** foram cationizadas<sup>29</sup> (esquema 2.9) e (figura 2.2).

Estas reacções foram realizadas em DMF seca adicionando-se um grande excesso de iodeto de metilo relativamente à quantidade de porfirina usada. As reacções foram controladas por TLC verificando-se que as porfirinas **1** e **5**, ao fim de três horas a 40 °C, encontravam-se totalmente metiladas e o dímero **10** ao fim de sete horas. Depois de arrefecer as misturas reaccionais à temperatura ambiente os produtos foram precipitados por adição de éter etílico. Após precipitação, os produtos foram filtrados\* e reprecipitados numa mistura água/acetona. Os produtos **11**, **12** e **13** foram obtidos com rendimentos de 97, 91 e 95%, respectivamente.



\* Uma vez que o iodeto de metilo é extremamente tóxico, todos os produtos resultantes de metilações foram precipitados, filtrados e a água mãe foi tratada com dietilamina, de forma a que esta destruísse o iodeto de metilo em excesso.

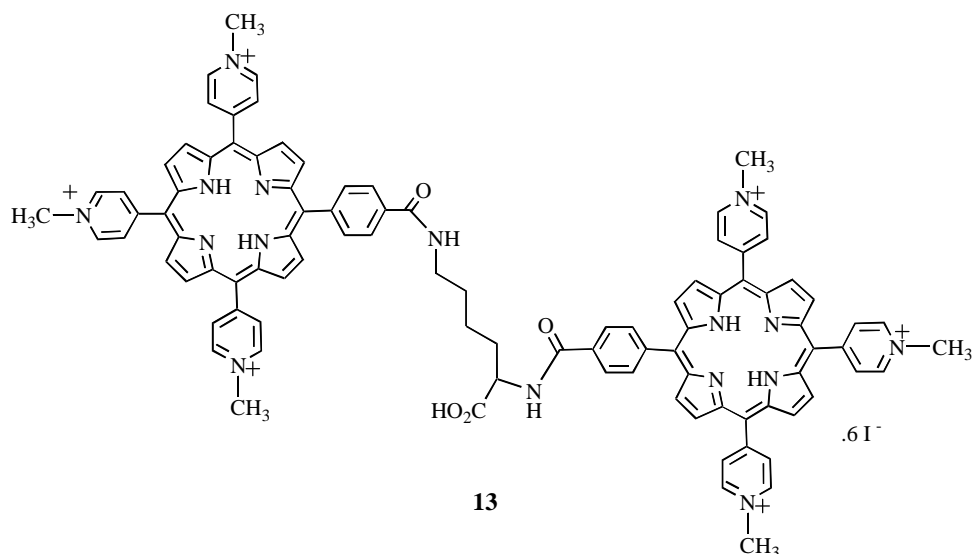


Figura 2.2 Dímero totalmente metilado

Os compostos **11** e **12** foram caracterizados por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$  e o primeiro foi ainda caracterizado por análise elementar e por espectroscopia de visível.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes compostos, o singuleto que aparece entre  $\delta$  4,7 e 4,8 ppm é o sinal mais característico, sendo atribuído à ressonância dos prótons dos grupos metilo ligados aos azotos dos grupos piridilo. De frisar ainda que na zona aromática, relativamente aos compostos não catiónicos respectivos, houve um desvio para campos mais baixos dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons dos grupos piridilo. A maior diferença é notada no entanto nos sinais dos prótons *orto* que antes da cationização se encontravam a cerca de  $\delta$  8,1 ppm e depois apareceram a cerca de  $\delta$  9 ppm caindo mesmo na zona de frequências dos prótons  $\beta$ -pirrólicos. Tal facto deve-se à desprotecção deste prótons devido à carga positiva alojada no azoto piridínico.

As estruturas dos compostos **11** e **12** foram também confirmadas por espectrometria de massa apresentando picos a  $m/z$  706 e 803 ( $\text{M}-3\text{I}^+$ ), respectivamente.

O dímero **10** é completamente insolúvel em DMSO, mas com a transformação realizada originou o produto **13** que é solúvel em solventes polares como o DMSO e a água, os solventes mais utilizados em testes biológicos.

A metilação total dos azotos piridínicos foi confirmada por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ . Verifica-se a presença de seis grupos metilo (18H), os quais aparecem na forma de



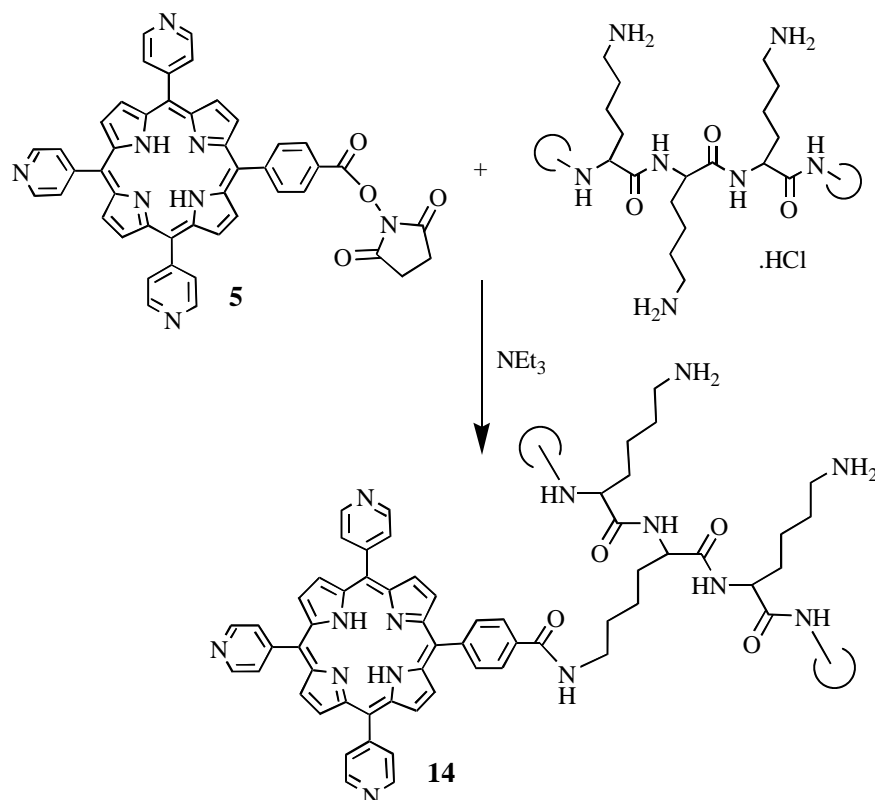
dois singuletos a  $\delta$  4,71 e a 4,72 ppm. Os sinais da zona aromática aparecem agora melhor definidos do que no dímero precursor. Nesta zona observa-se um multipeto a  $\delta$  8,33-8,45 ppm devido à ressonância dos prótons dos dois grupos fenilo substituídos, um outro multipeto a  $\delta$  8,98-9,17 ppm (28H) correspondente à ressonância dos prótons  $\beta$ -pirrólicos e *orto* dos grupos piridilo, e um dupeto ( $J= 6,2$  Hz) a  $\delta$  9,48 ppm correspondente à ressonância dos doze prótons *meta* dos grupos piridilo.

#### **2.2.4 Acoplamento das porfirinas 1 e 11 a polilisina com 1 a 4 KD**

##### **2.2.4.1 Reacção do éster activado 5 a polilisina**

Conhecidas as condições de acoplamento de **1** a lisina, aplicou-se o mesmo procedimento para o seu acoplamento a polilisina.

A polilisina adquirida comercialmente na forma de sal de ácido clorídrico apresenta-se na forma de pequenos grânulos muito higroscópicos. Este facto levou-nos a pesar o polímero directamente para o balão reaccional ao qual se adicionou DMSO seco. A dissolução da polilisina foi facilmente conseguida quando se adicionou uma pequena quantidade de trietilamina. A esta solução foi então adicionada, gota a gota, a porfirina **5** dissolvida em DMSO seco (esquema 2.10). A mistura reaccional foi mantida em agitação a 40 °C (à temperatura ambiente verificou-se que a reacção não era completa), sob atmosfera de azoto. A reacção foi seguida por TLC, verificando-se ao fim de vinte e quatro horas que praticamente toda a porfirina de partida havia sido consumida, dando-se dessa forma a reacção por terminada.



Esquema 2.10

Terminada a reacção de acoplamento das unidades porfirínicas ao polímero, foi necessário purificar o produto obtido, não só de alguma porfirina de partida que não havia reagido mas também da trietilamina e do DMSO. Existiam duas hipóteses: ou se cromatografava o produto, mas nunca em fases adsorventes uma vez que o produto é muitíssimo polar [em TLC de sílica, mesmo usando eluentes como  $\text{AcOH/MeOH/H}_2\text{O}$  (5:2:1) não eluia], ou se dialisava. Escolheu-se a segunda alternativa por se conseguir trocar facilmente o DMSO por solventes aquosos, sem a necessidade de levar o polímero à secura, evitando o risco de agregação irreversível. Assim a solução resultante foi transferida para uma manga de diálise (“cut off”: 1000 D) e dialisou-se durante dois dias contra DMSO (cerca de dez vezes o volume da reacção), para remover alguma porfirina livre e a trietilamina. Em seguida dialisou-se contra um gradiente de água destilada/DMSO. O gradiente crescente de água em DMSO não permitiu que a pressão osmótica fosse extremamente elevada, evitando assim o risco da membrana de diálise rebentar. Neste caso observou-se que a solução no interior da manga (retentato) começou a ficar turva e à medida que aumentava a proporção de água nesta, o polímero deu origem

a agregados. Verificou-se no entanto que estes eram insolúveis em DMSO e mesmo em soluções acidificadas.

Depois de se ter estudado as condições para o acoplamento, surge então mais uma dificuldade. Para a resolver pensou-se, então, em dialisar o conteúdo de uma nova reacção contra uma solução aquosa de ácido clorídrico (1%)/metanol (1:1). Inicialmente começamos por dialisar contra um gradiente crescente dessa solução [solução aquosa de ácido clorídrico a 1%/metanol (1:1)] em DMSO, novamente, para evitar uma grande pressão osmótica sobre a manga de diálise. A diálise deu-se por terminada após se ter verificado já não haver mais DMSO no retentato, confirmação obtida por análise espectroscópica de ultravioleta, pelo desaparecimento do sinal a 206 nm ( $\lambda_{\text{máx.}}$  do DMSO). Tanto o polímero como a porfirina de partida são bastante solúveis nesta mistura alcoólica ácida. O conteúdo da manga de diálise foi colocado num balão de fundo redondo, concentrado a pressão reduzida, sem ultrapassar os 35 °C, até um pequeno volume. A solução inicial de cor avermelhada adquiriu uma cor verde intensa, após a remoção do metanol.

O concentrado foi então transferido para um porta amostras de plástico, congelado em azoto líquido e liofilizado. Obteve-se, dessa forma um sólido floculoso de cor verde escuro correspondente ao polímero **14** com um rendimento de 48%. A diferença deste rendimento para o que se previa por TLC ( $\approx 100\%$ ), levou-nos a concluir que se perdeu muito polímero durante a diálise. Tal facto deve-se ao limite de retenção da manga de diálise ser muito próximo do tamanho dos polímeros de massa menor ( $\approx 1$  KD).

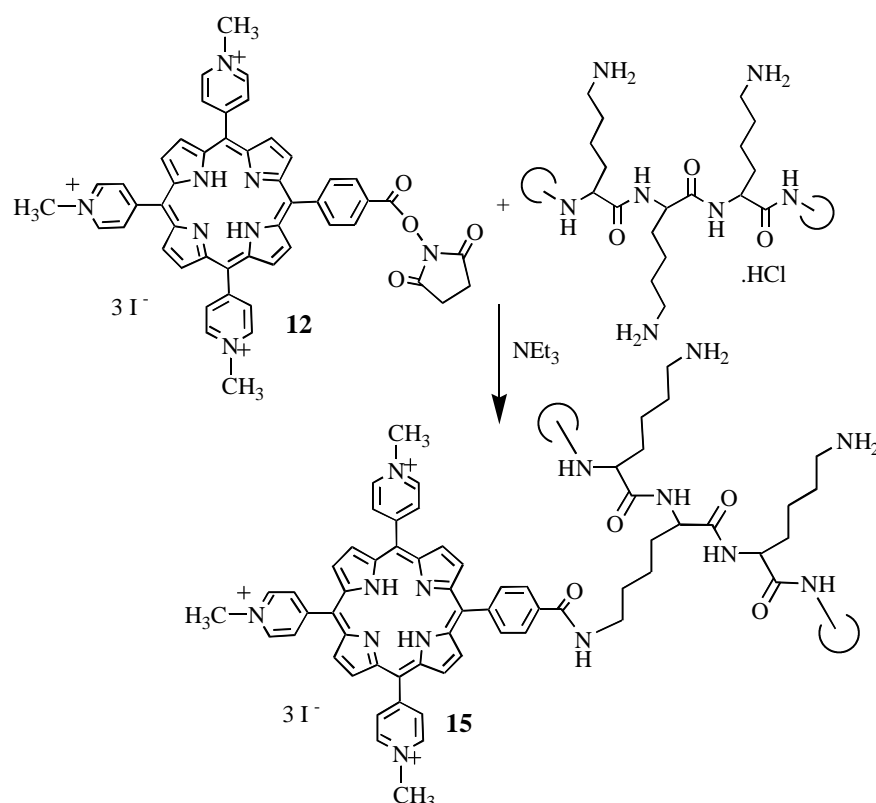
A quantidade de fotossensibilizador ligado covalentemente à polilisina foi determinada, por espectroscopia de visível, através do valor da absorvidade molar da banda Soret da porfirina **1**. Verificou-se que o polímero era constituído em 28% pelo fotossensibilizador **1**.

#### 2.2.4.2 Reacção do éster activado metilado **12** a polilisina

O procedimento para a síntese deste polímero é análogo ao descrito para a síntese do anterior, mas agora usando o éster activado catiónico **12** (esquema 2.11). A reacção decorreu durante três dias, não tendo no entanto sido completa como a anterior. A

purificação foi também realizada de uma forma análoga, obtendo-se 68 mg (47%) de polímero **15** liofilizado.

A quantidade de fotossensibilizador ligado covalentemente à polilisina foi igualmente determinada, utilizando para isso uma solução de **15** em PBS, e o valor da absorvidade molar da banda Soret de **11** em PBS. A percentagem da porfirina no polímero é de 32%.



Esquema 2.11

#### 2.2.4.3 Metilação total do polímero não-catiónico

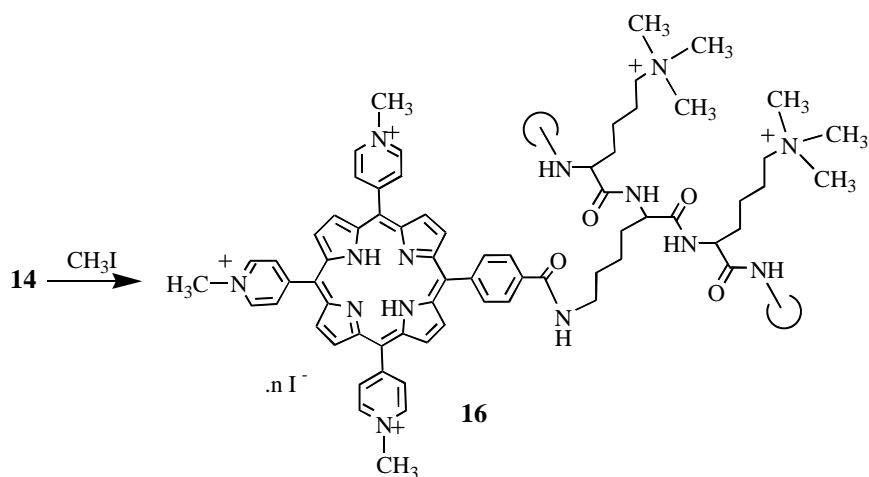
Para terminar, e sempre com o objectivo de fazer ensaios biológicos com os produtos sintetizados, pareceu-nos interessante obter um polímero totalmente metilado para fazer estudos comparativos e ver até que ponto os terminais amina livres da polilisina eram importantes na adsorção ou penetração nas membranas biológicas, assim como um aumento significativo do número de cargas positivas no conjugado. Assim, depois de se ter preparado o polímero **14**, sem qualquer purificação e no seu meio reaccional (DMSO),

procedeu-se ao seu tratamento com um largo excesso de iodeto de metilo durante sete horas a 40 °C (esquema 2.12). A reacção foi monitorizada por TLC, usando como eluente uma mistura de AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:2:1).

Neste caso, a purificação do polímero **16** foi um pouco diferente das anteriores, uma vez que a diálise da mistura reaccional contra a solução aquosa de ácido clorídrico a 1%/metanol (1:1) precipitava o polímero no interior da manga de diálise. Mas neste caso, verificámos que o polímero era solúvel em DMSO, ao contrário do que aconteceu no caso em que os terminais amina da polilisina não estavam metilados.

Para liofilizar o polímero, como era nosso objectivo, a diálise foi então tentada contra outras misturas, por ex.: tampão fosfato a pH=7, solução básica de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O e solução aquosa de ácido clorídrico a 1% (v/v). Nesta última o polímero era solúvel e assim conseguiu-se trocar o DMSO por uma solução aquosa que após concentração e liofilização originou **16**, com um rendimento de 46%.

Não foi possível determinar a quantidade de fotossensibilizador ligado covalentemente a polilisina, uma vez que parte do polímero **16** precipitava em PBS. Também, por esse facto, a solução “stock” deste polímero para os ensaios biológicos foi preparada mais diluída e deixada durante a noite no frigorífico para estabilizar. Só no dia seguinte foi filtrada e a concentração do fotossensibilizador em solução determinada por espectroscopia de visível.



Esquema 2.12

### 2.3 Ensaaios bacteriológicos

A avaliação das propriedades biológicas de um determinado composto é um processo dispendioso e multidisciplinar. Normalmente essa avaliação é efectuada por grandes laboratórios farmacêuticos; os bons resultados só passam a ser do conhecimento público depois dos seus direitos comerciais estarem muito bem acautelados. Estes direitos são normalmente protegidos sob a forma de registos de patente. Mesmo assim, nem sempre é possível obter a colaboração desses laboratórios, ou de outros grupos, para fazerem alguns ensaios biológicos, ainda que preliminares.

Com o objectivo de pelo menos ter uma ideia da actividade dos compostos por nós sintetizados, propusemo-nos a realizar alguns desses ensaios. Não existindo as condições necessárias para efectuar os referidos estudos na Universidade de Aveiro, foi no entanto possível realizar alguns deles, ainda que preliminares, graças a uma estreita colaboração com o grupo do Professor G. Jori do Departamento de Biologia da Universidade de Pádua. Como vimos no início deste capítulo, compostos análogos aos por nós sintetizados apresentam propriedades bactericidas. Em Pádua, com equipamento específico, microrganismos controlados e o conhecimento necessário, foi possível realizar vários estudos fotofísicos e biológicos que nos permitiram fazer uma triagem dos compostos mais promissores. Os resultados obtidos abrem boas perspectivas para ensaios mais avançados para alguns deles, e são ainda importantes para planear futuro trabalho de síntese de compostos mais direccionados para a inactivação bacteriana.

Os ensaios bacteriológicos foram realizados, *in vitro*, sobre quatro estirpes bacterianas, patogénicas:

- Duas *Staphylococcus aureus* (fig. 2.2), a *S. aureus* ATCC e a *S. aureus* MRSA, agentes patogénicos Gram-positivos;
- Duas Gram-negativas, a *Escherichia coli* (*E. coli*) (fig.2.2) e a *Pseudomonas aeruginosa* (PAO-1).

As primeiras células são cocos Gram-positivos enquanto a *E. Coli* é um bacilo Gram-negativo (fig.2.3).

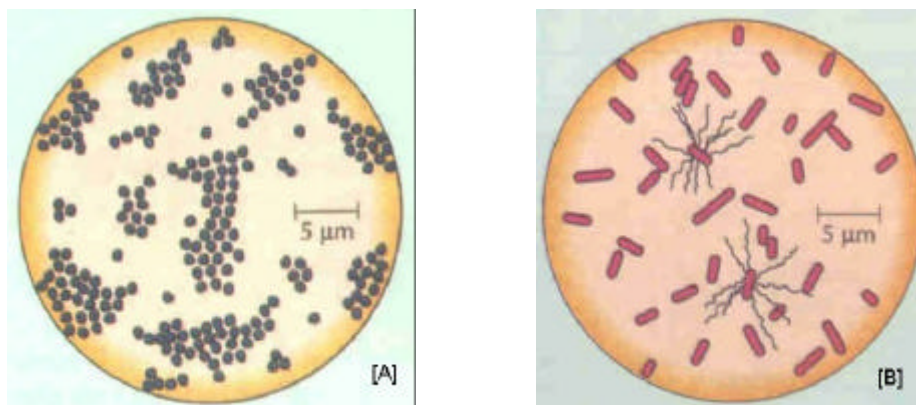


Figura 2.3<sup>30</sup> Fotografias de colónias de bactérias coradas pela técnica de Gram: [A] *Staphylococcus aureus* e [B] *Escherichia coli*

O *S. aureus*, descoberto em 1881 por Ogston, faz parte da flora normal no Homem; é o habitante mais comum da pele e da nasofaringe. Assim, quando ocorrem ferimentos ou incisões cirúrgicas estes microrganismos podem facilmente ter acesso a estes ferimentos e provocar infecções, normalmente com tratamento complicado devido à grande resistência que algumas estirpes apresentam a vários antibióticos. Por exemplo a maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* são resistentes às penicilinas naturais, uma vez que as conseguem destruir através da enzima penicilinase. No entanto, certas penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina, podem tratar infecções estafilocócicas “penicilina-resistentes”. Mas algumas estirpes mutantes de *S. aureus* são também resistentes à meticilina.

Como já foi dito anteriormente, tivemos a oportunidade de realizar testes biológicos sobre esta estirpe resistente de *S. aureus* - a *S. aureus* MRSA (methicilin resistant *S. aureus*). Detectada pela primeira vez em 1975 na Austrália, a sua presença tem vindo a aumentar consideravelmente, assim como outras estirpes resistentes.

O *S. aureus* pode levar a graves complicações, como por exemplo a osteomielite crónica, uma infecção óssea que é bastante difícil de tratar, a meningite, e abscessos em vários órgãos internos.

A *E. coli* também faz parte da flora normal do Homem, habitando no trato intestinal. No entanto, quando introduzida no trato urinário causa infecções graves.

Quanto à *P. aeruginosa*, causa principalmente infecções em queimaduras e feridas, mas também pode causar infecções do trato respiratório inferior e urinário. A infecção

localizada pode levar à invasão generalizada pela corrente sanguínea. Esta bactéria é resistente à maioria dos antibióticos.

O *S. aureus*, a *E. coli* e a *P. aeruginosa* fazem parte dos microrganismos que infectam hospedeiros cujo sistema imunitário se encontra debilitado, normalmente devido a doença prolongada, quimioterapia, radioterapia, SIDA, transplantes, cirurgias ou outros tratamentos médicos. Estes microrganismos estão directamente relacionados com bastantes infecções nosocomiais (hospitalares).

Depois da apresentação, ainda que bastante breve, das bactérias com que realizámos os ensaios bacteriológicos dos nossos compostos, cabe agora apresentar os procedimentos e as técnicas utilizadas em laboratório.

Os procedimentos detalhados de cada técnica utilizada encontram-se descritos na parte experimental dos ensaios biológicos. No entanto, para introduzir o leitor, ainda que de uma forma breve, vamos apresentar os pontos mais importantes em cada um dos ensaios de avaliação da actividade bacteriológica dos derivados porfirínicos de polilisina, **14**, **15** e **16** e das porfirinas que lhes deram origem **1** e **11** (anexo 1).

Prepararam-se soluções “stock” dos compostos catiónicos (**11**, **15**, **16**) em PBS, da porfirina não catiónica (**1**) em DMSO e do polímero não catiónico (**14**) em DMSO com 10% de H<sub>2</sub>O. A concentração de fotossensibilizador existente em cada solução “stock” de polímero foi determinada utilizando o valor da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da banda Soret da correspondente porfirina acoplada, diluindo um volume conhecido dessas soluções num determinado volume de PBS ou DMSO, consoante o caso.

Antes de realizar ensaios com as células, foi necessário produzi-las a partir das linhas celulares mantidas em placas de Petri contendo um meio sólido rico em nutrientes que satisfizessem as necessidades nutricionais dos microrganismos (BHA) a 4 °C. Os meios sólidos são usados no isolamento, conservação, multiplicação e contagem de colónias de microrganismos, como se irá salientar ao longo deste subcapítulo. A técnica utilizada foi a inoculação em placa, que consiste em inocular (semear) uma colónia de linha numa pequena placa de Petri com BHA. Tratando-se de culturas puras, dispondo de meio abundante em nutrientes e sujeitas à temperatura óptima de crescimento, ou seja em condições ideais para o seu desenvolvimento, estas multiplicam-se exponencialmente. Ao fim de cerca de dezasseis horas, recolhem-se e depois de devidamente tratadas e a sua



concentração determinada, tem-se bactérias suficientes para realizar estudos *in vitro* durante um dia.

### 2.3.1 Estudos e resultados de fotoestabilidade dos compostos

Antes de se efectuarem estudos de PDT é muito importante conhecer a fotoestabilidade dos compostos quando irradiados com luz igual à que vai ser usada nos estudos de fotoinativação.

Todos os compostos foram sujeitos a ensaios de fotoestabilidade, permitindo determinar a percentagem de fotossensibilizador degradado ao longo do tempo de exposição à mesma potência de luz usada na fotoinativação das células bacterianas. Ou seja, determinar a fotodecomposição que os compostos sofrem ao longo do tempo de irradiação, em condições análogas às que se realizam nos testes de PDT. O processo de fotossensibilização indica-nos a maior ou menor estabilidade dos compostos em se auto-oxidarem em presença de uma determinada quantidade de luz. É a partir deste parâmetro fotofísico que podemos definir o tempo de irradiação nos testes fotodinâmicos.<sup>31</sup>

Estes estudos foram realizados expondo à luz branca ( $50 \text{ mW/cm}^2$ ) uma solução de concentração  $1 \mu\text{M}$  de fotossensibilizador em PBS, mantida em agitação e à temperatura ambiente, numa célula de quartzo. Em períodos de irradiação preestabelecidos, foram registados espectros de visível da solução. A título de exemplo, apresentamos na figura 2.4 os espectros obtidos para a porfírina **11** e na figura 2.5 aos obtidos para o polímero totalmente metilado **16**.

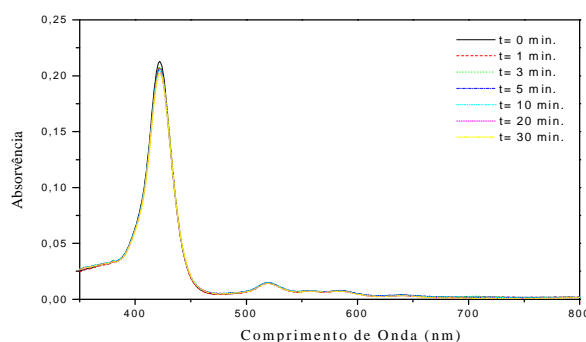


Figura 2.4 Espectros de visível de **11**, após cada período de irradiação da solução

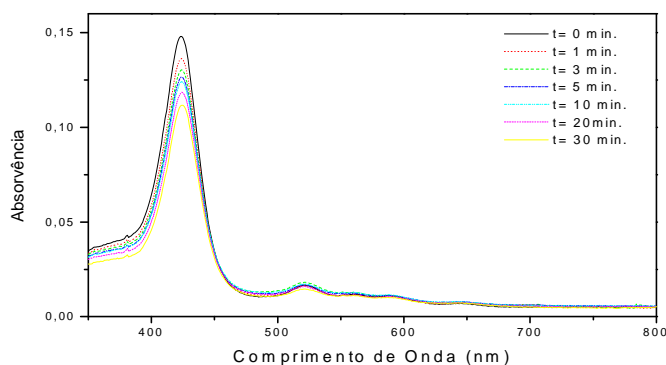


Figura 2.5 Espectros de visível de **16**, após cada período de irradiação da solução

Os resultados de fotoestabilidade dos compostos encontram-se apresentados na tabela 2.1

	Tempo de irradiação (min.)						
Compostos	0	1	3	5	10	20	30
<b>1</b>	100	99	97	96	94	90	85
<b>11</b>	100	98	98	97	97	95	95
<b>14</b>	100	93	86	83	77	72	67
<b>15</b>	100	100	98	94	93	91	89
<b>16</b>	100	92	88	86	84	80	75

Tabela 2.1 Resultados de fotoestabilidade dos compostos estudados, a diferentes tempos de irradiação, em percentagem de fotossensibilizador não fotodegradado.

Da análise dos resultados da tabela anterior, podemos considerar que em geral os compostos são bastante fotoestáveis. A porfirimina **11** mantém-se praticamente inalterada durante os trinta minutos de irradiação; os composto **14** e **16** sofreram apenas alguma decomposição.

Dependendo da aplicação para que se pretendam os fotossensibilizadores, o facto de serem mais ou menos fotoestáveis é muito importante. Por exemplo, para uso

farmacológico, se no fim do tratamento, com êxito, os compostos se encontrarem degradados em produtos não tóxicos para as células sãs, pode mesmo ser uma vantagem, uma vez que se pode evitar a fotossensibilidade prolongada dos doentes. Por outro lado, se o objectivo for o de irradiar o mesmo fotossensibilizador várias vezes, convém que este seja bastante fotoestável. É o caso, por exemplo, dos compostos usados na esterilização de fluidos contaminados. Geralmente estes fotossensibilizadores encontram-se fixos a fases estacionárias, normalmente resinas, e são irradiados várias vezes.

### **2.3.2 Estudos de fotoinactivação de bactérias na presença dos derivados porfirínicos**

Para trabalhar com microrganismos em laboratório é necessário dispor de material, meios de cultura e ambiente estéreis. Os dois primeiros requisitos são relativamente fáceis de conseguir. Para satisfazer o último requisito usou-se uma câmara de fluxo laminar vertical (fig. 2.6) que possui um sistema de filtração de ar por membrana, purificando-o e criando assim no seu interior as condições de assepsia necessárias para a preparação e realização das experiências com bactérias.



Figura 2.6 Câmara de fluxo laminar vertical, apresentando algum material usado em bacteriologia

Neste ponto, apresentamos os estudos de susceptibilidade (toxicidade dos compostos nas células bacterianas sem serem irradiadas, ou seja no escuro), e fotoinativação (toxicidade dos compostos nas células bacterianas sujeitas a irradiação). A técnica laboratorial utilizada para as determinar foi a técnica de inoculação em placa, já abordada aquando da produção de bactérias, mas neste caso em vez de se semear uma colónia, inocula-se a placa com um determinado volume de suspensão bacteriana. Esta técnica permite uma quantificação da actividade biológica dos compostos estudados.

Para ter uma ideia da densidade bacteriana existente na suspensão a usar, determina-se a concentração de bactérias em suspensão pela densidade óptica (DO) a 650 nm, de uma suspensão celular diluída, por aproximação, de modo a obter uma DO igual a 0,7 correspondendo a uma concentração celular de  $10^8$ - $10^9$  (isto é, cerca de  $5 \times 10^8$ ) células/mL.

Assim, para o estudo da susceptibilidade bacteriana (na ausência de luz), uma suspensão de células com uma concentração de aproximadamente  $10^8$  células/mL, preparada a partir da anterior, foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com diferentes concentrações de derivado porfirínico. Após este pré-tratamento de dez minutos com o derivado porfirínico, semeou-se um determinado volume das diferentes suspensões directamente nas placas (sem irradiação). Este é o controlo no escuro.

Para a fotoinativação fez-se novamente o mesmo pré-tratamento de dez minutos, e as suspensões bacterianas nas diferentes concentrações de fotossensibilizador foram logo de seguida irradiadas com uma luz branca de intensidade  $50 \text{ mW/cm}^2$ , durante trinta minutos (fig. 2.7), o que corresponde a uma dose total de energia de  $90 \text{ J/cm}^2$ . Só depois da irradiação é que um volume oportuno de cada suspensão foi semeado em placa.

Cabe realçar que o tempo óptimo de irradiação para cada conjunto composto-célula não foi determinado. Uma vez que todos os compostos tinham uma fotoestabilidade semelhante optou-se por usar o mesmo protocolo para todos os ensaios.



Figura 2.7 Fonte de energia usada para irradiar as células na presença de diferentes concentrações de fotossensibilizador.

Assim que as bactérias em estudo se encontravam semeadas nas placas, estas eram deixadas na incubadora durante a noite a 37 °C. Durante esse período as células viáveis, sobreviventes aos diferentes tratamentos, desenvolveram-se dando origem a colónias visíveis a olho nu.

O teor de microrganismos viáveis foi determinado por contagem das colónias formadas e expresso em “unidades formadoras de colónias” (UFC).<sup>32</sup> Se as células microbianas viáveis, não forem demasiadas, e se se encontrarem bem dispersas (sementeira bem executada), cada colónia formada corresponde a uma célula inicial viável, isto é, que sobreviveu ao tratamento só com droga ou com droga e luz (fig. 2.8). No entanto, se a quantidade de colónias for tão elevada que não se consigam distinguir, então não há correspondência entre o número de colónias e o número inicial de microrganismos. Nesse caso, os resultados são definidos como “não contáveis”.



Figura 2.8 Exemplo de placas obtidas após tratamento com diferentes concentrações de fotossensibilizador.

Enquanto que o primeiro estudo permite determinar a sobrevivência celular nas diferentes concentrações de droga e na ausência de irradiação, isto é, a susceptibilidade da bactéria à droga, o segundo dá-nos os resultados de sobrevivência das células viáveis após tratamento fotodinâmico (PDT). A sobrevivência é inversamente proporcional à toxicidade do composto nas células em qualquer dos estudos.

Os ensaios foram repetidos em experiências independentes e realizados sobre as estirpes bacterianas na fase de crescimento exponencial, com pequenas doses de fotossensibilizador e luz, uma vez que numa fase de latência, apenas uma pequena fracção das bactérias seriam mortas.<sup>4</sup>

É conveniente referir que foram realizados ensaios preliminares que serviram para avaliarmos, de forma rápida, a actividade dos compostos. Além disso, os resultados obtidos permitiram-nos programar diluições e quantidades das diferentes suspensões a semear em placas inteiras, ou seja, determinar o melhor “protocolo” para cada binómio célula-fotossensibilizador. Assim, enquanto que as sementeiras nos primeiros ensaios de fotoinactivação foram realizadas em fracções de placa (fig. 2.8), depois dos resultados preliminares programaram-se sementeiras de modo a ocupar toda a placa de Petri.

Foram também realizados testes de controlo. Para cada suspensão de bactérias de “trabalho” (que não tiveram qualquer contacto com droga) foi determinado, sempre pelo

método de inoculação em placa, o número exacto de bactérias viáveis existente na suspensão inicial, em unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL). A DO previamente realizada, é directamente proporcional ao número de células viáveis e não viáveis, enquanto que o método das placas quantifica apenas as células viáveis, como já tivemos oportunidade de escrever.

O efeito da luz sobre cada estirpe bacteriana (controlos com luz), foi determinado irradiando uma suspensão de bactérias com a concentração de trabalho ( $10^8$  células/mL) durante o mesmo período de tempo (trinta minutos).

A sobrevivência das células bacterianas, nos ensaios anteriores, é apresentada em percentagem relativa ao número de colónias obtidas nos controlos das suspensões de bactérias de “trabalho” (100% de sobrevivência). Os resultados obtidos com os vários fotossensibilizadores nos diferentes testes sobre cada uma das bactérias, são apresentados nos gráficos 2.1a, 2.2a, 2.3a e 2.4a, seguidos dos respectivos resultados de quantificação de fotossensibilizador ligado a cada uma delas (ver ponto 2.3.3). Assim, pode-se confrontar ambos os resultados, para uma melhor análise e discussão dos mesmos.

Os ensaios foram repetidos em experiências independentes, pelo menos duas vezes; o que apresentamos é a média dos resultados obtidos e os seus desvios padrão.

### **2.3.3 Determinação da quantidade de fotossensibilizador ligado às células bacterianas**

Sabendo que um dos pré-requisitos para a fotossensibilização das células microbianas é a “ligação” do fotossensibilizador à célula, é importante determinar a quantidade de fotossensibilizador acumulado nessas células. O método utilizado para essa quantificação foi o método fluorimétrico.

Este estudo, nas diferentes estirpes, foi realizado nas mesmas condições (concentrações de fotossensibilizador e células, tempo e condições de incubação) usadas para os estudos de susceptibilidade bacteriana. Assim, dez minutos após a incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, cada suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante dez minutos, o sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspense em SDS a 2%.

De cada tubo de lisado bacteriano foram retiradas duas alíquotas, uma para determinar a quantidade de fotossensibilizador ligado as células e a outra para dosear as proteínas celulares. Para o primeiro caso, foi necessário diluir cada alíquota de lisado, a uma concentração adequada, em SDS a 2%, e os espectros de fluorescência foram registados no intervalo entre 600-800 nm com excitação no comprimento de onda da banda Soret. Por interpolação de uma recta de calibração realizada para o fotossensibilizador **11** as intensidades de fluorescência foram convertidas em concentrações de fotossensibilizador. No segundo caso, o doseamento de proteína bacteriana, foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA).<sup>33</sup> A partir de uma recta de calibração, efectuada com soluções de albumina bovina de concentrações conhecidas e expostas aos mesmos tratamentos, extrapolou-se a quantidade de proteína em cada amostra. As absorvências foram assim convertidas em concentrações de proteína (mg/mL).

A quantidade de fotossensibilizador ligado às células bacterianas, nas diferentes concentrações de porfirina, vem expressa em nmol de porfirina/mg de proteína. Os resultados e os desvios padrão dos mesmos são apresentados nos gráficos 2.1b, 2.2b, 2.3b e 2.4b e representam a média dos valores de, pelo menos, duas experiências independentes.



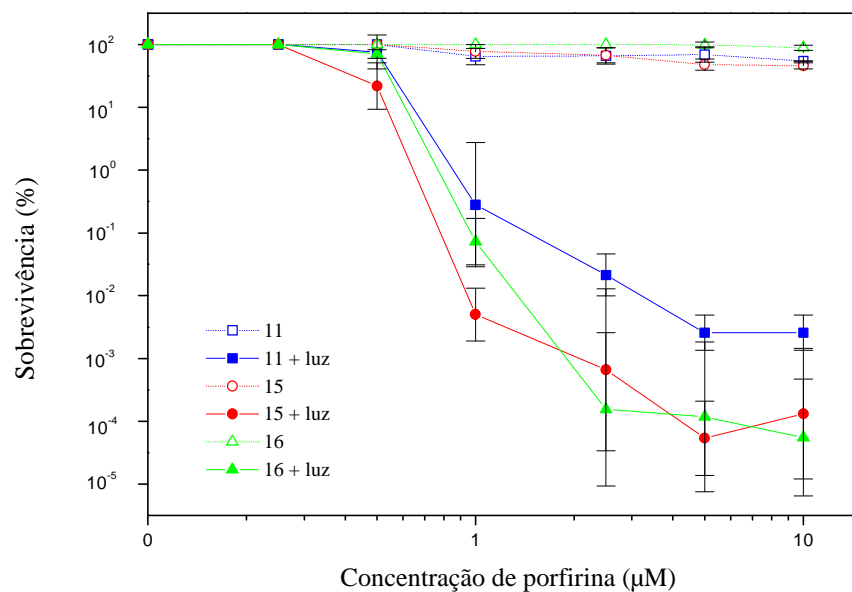


Gráfico 2.1a Percentagem de sobrevivência das células bacterianas *S. aureus* ATCC 25923 (Gram-positiva), no escuro e na presença de luz.

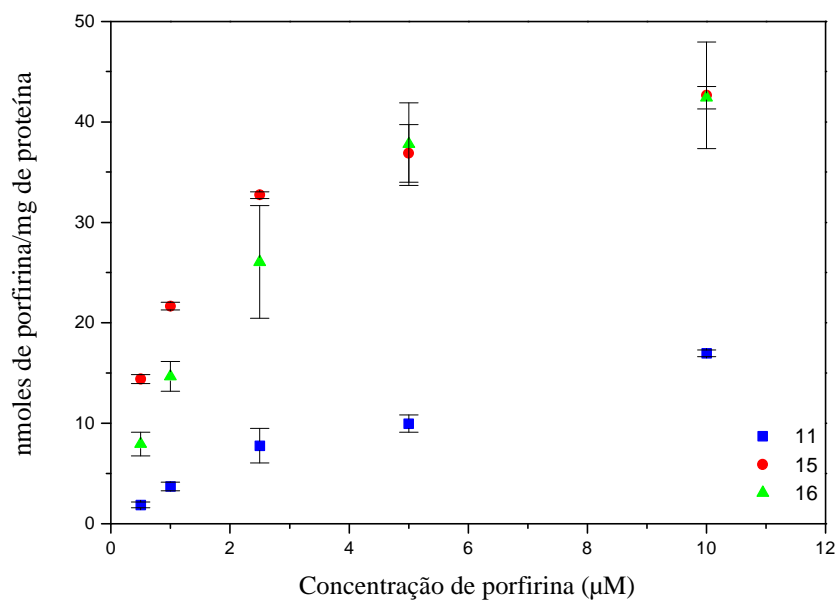


Gráfico 2.1b Quantidade de porfirina ligada às células bacterianas *S. aureus* ATCC 25923.

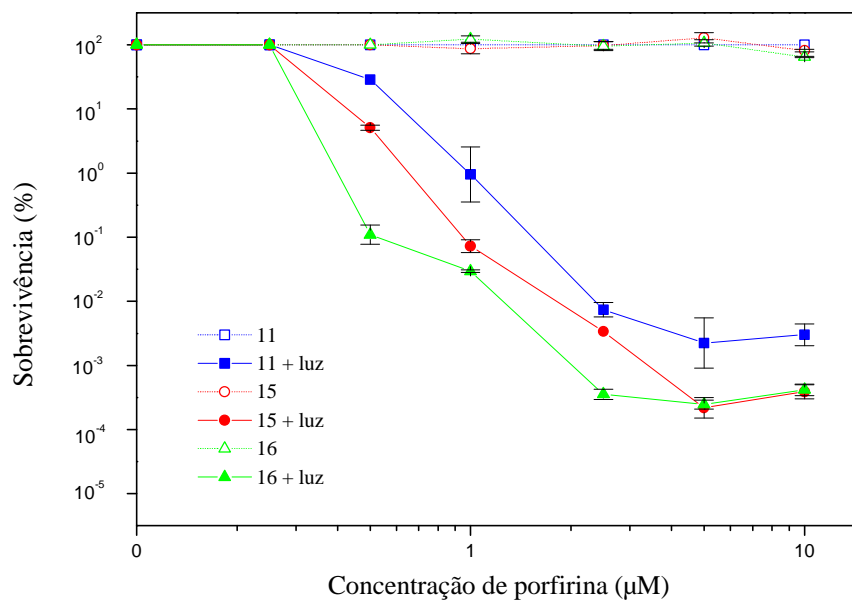


Gráfico 2.2a Percentagem de sobrevivência das células bacterianas *S. aureus* MRSA (Gram-positiva), no escuro e na presença de luz

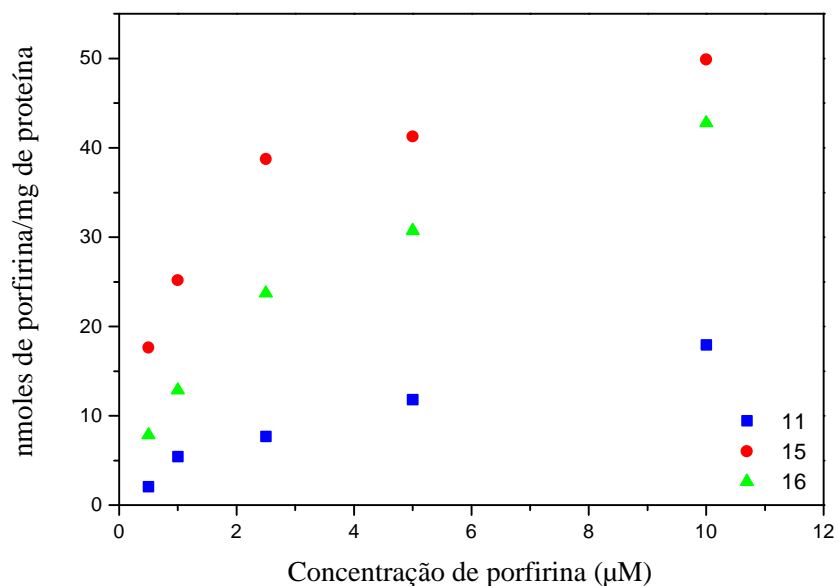


Gráfico 2.2b Quantidade de porfina ligada às células bacterianas *S. aureus* MRSA

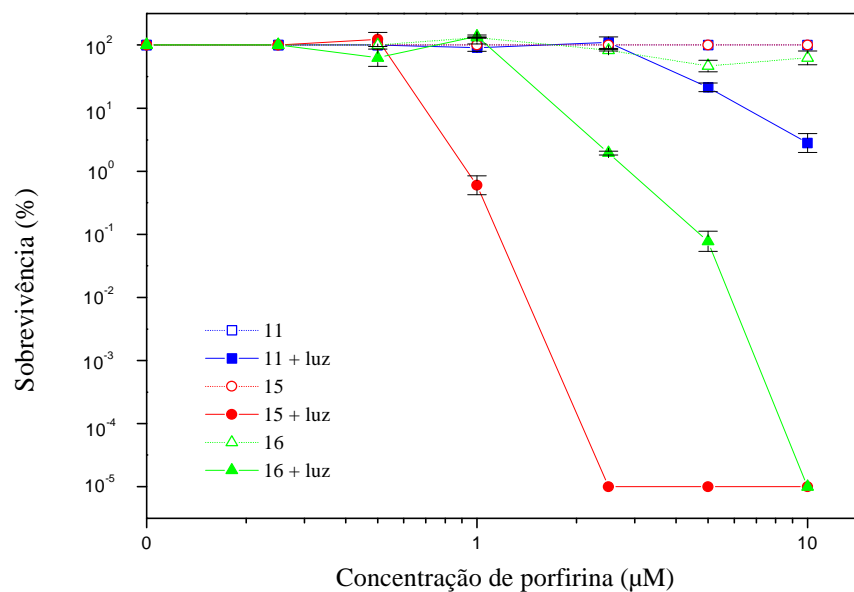


Gráfico 2.3a Percentagem de sobrevivência das células bacterianas *E. coli* 04 (Gram-negativa), no escuro e na presença de luz

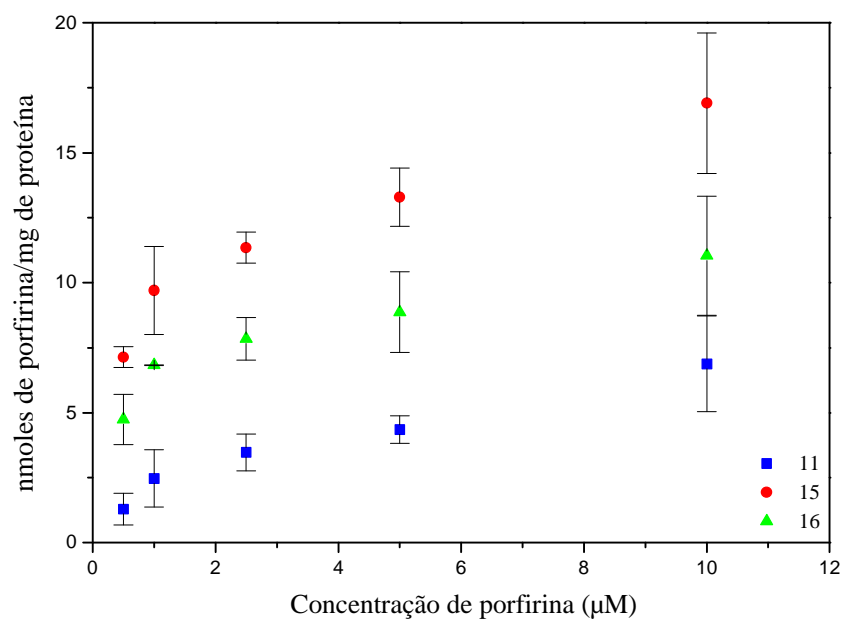


Gráfico 2.3b Quantidade de porfirina ligada às células bacterianas *E. coli* 04

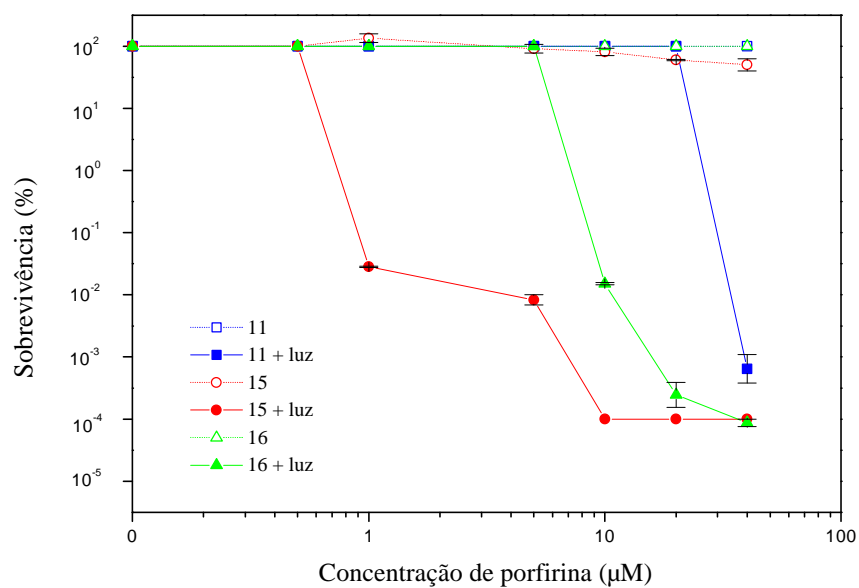


Gráfico 2.4a Percentagem de sobrevivência das células bacterianas *P. aeruginosa* PAO-1 (Gram-negativa), no escuro e na presença de luz

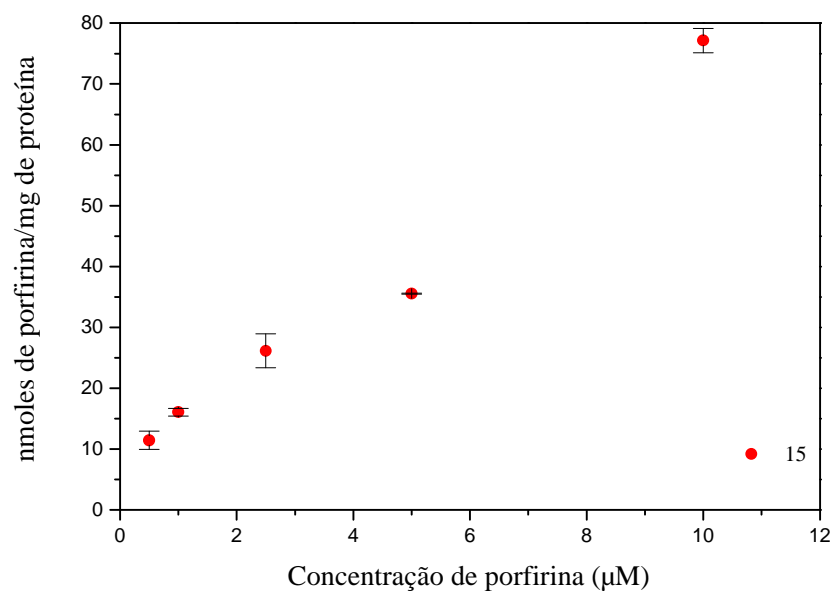


Gráfico 2.4b Quantidade de porfirina ligada às células bacterianas PAO-1

### 2.3.4 Discussão dos resultados obtidos

Gostaria aqui de referir que o protocolo ideal para cada situação “concentração do fotossensibilizador – estirpe bacteriana - tempo de irradiação” não foi determinado. No entanto, uma vez que os compostos tinham uma fotoestabilidade semelhante, optou-se por se usar o mesmo protocolo para todos os ensaios, o que nos permitiu comparar a actividade destes nas mesmas condições.

É de salientar também que os testes de irradiação das quatro estirpes bacterianas com os 90 J/cm<sup>2</sup> não lhes provocou qualquer diminuição na sua taxa de sobrevivência, ou seja, sem drogas e naquelas condições de luz as bactérias mostraram-se indiferentes a esta (controles com luz).

Como já tínhamos dito, fez-se uma primeira avaliação da actividade biológica dos derivados porfirínicos com o objectivo de se determinar, por aproximação, o seu efeito bactericida. Os resultados destes ensaios permitem-nos determinar quais as quantidades de suspensão a semear para ter um número contável de colónias nas placas. De um modo geral, a “quantidade” de bactérias a semear é directamente proporcional à concentração do fotossensibilizador. Permitiu ainda fazer uma triagem dos compostos mais activos e das concentrações de fotossensibilizador com maiores ou menores potencialidades bactericidas. Estes resultados, feitos em fracções de placas de Petri, como já se descreveu, não são apresentados.

Devemos ainda realçar que quando realizámos os ensaios preliminares com a porfirina **1**, não catiónica, sobre a *E.coli*, Gram-negativa, já esperávamos que esta não apresentasse fotoinactivação. No entanto estávamos curiosos em saber se a introdução da polilisina (conjugado **14**) iria ou não alterar esta situação. A curiosidade foi desfeita, pela negativa, uma vez que os resultados do conjugado **14** sobre a *E. coli* não foram nada animadores, bem pelo contrário. Os estudos preliminares de PDT realizados com a porfirina **1** e com o polímero **14** originaram um número “não contável” de colónias de *E. coli*, mesmo na concentração máxima testada (10 µM). Sabendo que a carga do fotossensibilizador não é tão importante nas bactérias Gram-positivas, testamos também o efeito fotodinâmico do polímero **14** sobre a *MRSA*. Também sobre esta, para concentrações iguais ou inferiores a 1 µM, o resultado obtido foi um número “não

contável” de colónias. No entanto, para concentrações maiores, apresentou alguma fotoinactivação.

Assim, ainda tentámos confirmar a importância da polilisina e das cargas positivas na acumulação do fotossensibilizador e consequente fotoinactivação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Este estudo foi efectuado usando o polímero **14** sobre a *MRSA* e a *E. coli*. No entanto, nas condições em que realizamos o teste (PBS) o polímero precipitou, não permitindo obter resultados reais (a razão nmoles de porfirina/mg de proteína foi muito elevada).

Apesar de um dos objectivos deste trabalho ser comparar os resultados obtidos com os compostos não-catiónicos com os obtidos com os compostos catiónicos, resolvemos dedicar o resto do tempo aos últimos. Isto porque os não-catiónicos não estavam a dar os melhores resultados (já esperados!) e precisávamos de encontrar um protocolo diferente para estes. A falta de tempo levou-nos mesmo a abandonar os testes com os compostos não-catiónicos.

Apresentados os resultados dos compostos não-catiónicos testados, iremos agora debruçarmo-nos sobre os resultados obtidos com os catiónicos, os quais se encontram nos gráficos apresentados anteriormente. Da sua análise pode-se retirar algumas informações interessantes:

- as diferentes células bacterianas respondem de maneira diferente ao tratamento com um determinado composto.

- os ensaios de toxicidade na ausência de luz mostraram que todos os fotossensibilizadores, incluindo os dois não-catiónicos **1** e **14**, apresentavam uma toxicidade desprezável para as diferentes estirpes bacterianas. Acontecendo o mesmo quando os compostos eram usados nas concentrações mais elevadas (10  $\mu\text{M}$ ), e (50  $\mu\text{M}$ ) para a *P. aeruginosa*. Estes resultados contrastam com os obtidos na presença de luz (efeito de PDT), como se pode ver nos gráficos 2.1a, 2.2a, 2.3a e 2.4a).

- comparando os resultados obtidos por estes compostos (**11**, **15**, **16**), com os resultados preliminares dos compostos não-catiónicos **1** e **14** sobre a *MRSA* e a *E. coli*, confirma-se a importância das cargas positivas na acumulação e consequente fotoinactivação das bactérias Gram-negativas.

- no caso das bactérias Gram-positivas (gráficos 2.1 e 2.2), a porfirina **11** consegue valores de fotoinactivação próximos dos polímeros, mesmo com valores de acumulação

bastante inferiores a estes, o que demonstra que nas Gram-positivas a polilisina apesar de aumentar a quantidade de fotossensibilizador ligado as células, não aumenta significativamente a eficiência da PDT. Isto leva-nos a supor que a quantidade de fotossensibilizador não conjugado que se liga às células é suficiente para as inibir, ou que este penetra com maior facilidade nas células chegando a locais no seu interior mais susceptíveis à PDT. Desta forma, para obter o mesmo efeito de PDT não é necessário tanto fotossensibilizador, do que quando este se encontra ligado à polilisina. São apenas suposições, uma vez que nos faltam pelo menos dados fotofísicos dos compostos para esclarecer melhor estes resultados.

- os conjugados de polilisina **15** e **16** aumentam significativamente a quantidade de fotossensibilizador acumulado nas células. Nas duas estirpes Gram-positivas os resultados são idênticos, no entanto nas estirpes Gram-negativas temos valores completamente diferentes. No caso da *E. coli* (gráfico 2.3b) obtiveram-se os resultados esperados, ou seja, uma acumulação bastante inferior para todos os compostos, comparativamente com as Gram-positivas (gráficos 2.1b e 2.2b). O resultado menos esperado foi a elevada acumulação do polímero **15** na *P. aeruginosa* (gráfico 2.5). Enquanto que até à concentração de 5  $\mu\text{M}$  a acumulação é quase idêntica à verificada nas Gram-positivas, ela é bastante superior quando a concentração do polímero é de 10  $\mu\text{M}$ .

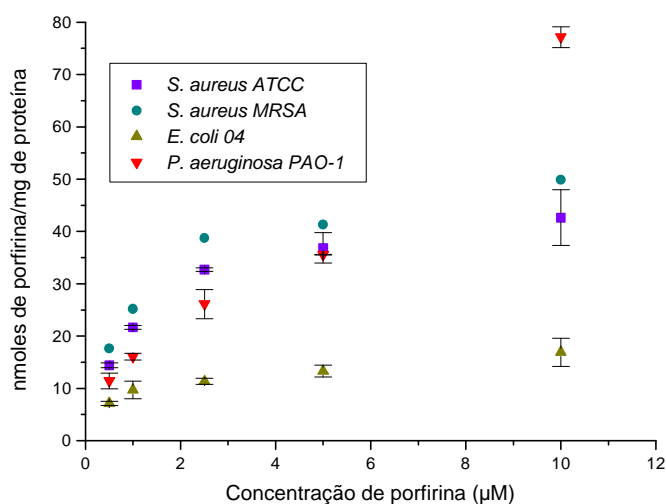


Gráfico 2.5 Quantidade de porfirina do polímero **15** ligada às diferentes células bacterianas

- a acumulação na *P. aeruginosa* só foi determinada para o polímero **15** uma vez que a porfirina **11** apenas apresentou fotoinactivação a 50  $\mu\text{M}$  e já não havia quantidade suficiente do composto **16** para preparar soluções de concentrações superiores às que se tinham até então usado (máximo 10  $\mu\text{M}$ ).

- o conjugado **16**, com os azotos da porfirina na forma catiónica, assim como os dos terminais amina da polilisina, trouxe apenas uma melhoria, que foi o aumento da fotoinactivação das Gram-positivas *MRSA*, mesmo com uma acumulação inferior ao do polímero **15** (gráficos 2.2a e 2.2b).

- contrariamente ao que seria de esperar, no caso das Gram-negativas, o polímero **16** não trouxe nenhuma mais-valia, bem pelo contrário, pois mostrou uma acumulação inferior ao de **15** e conseqüentemente uma menor fototoxicidade, levando-nos a concluir que cargas a mais não será o melhor, ou que as cadeias do polímero com o grupo amino sejam importantes não só para a acumulação, como para a fotoinactivação.

- o conjugado **15** é o mais eficiente contra as quatro bactérias já estudadas e relativamente à *P. aeruginosa*, a bactéria mais resistente nos nossos estudos, mostrou excelentes resultados, comprovados pelo estudo de acumulação do fármaco na referida bactéria, justificando-se estudos mais aprofundados.

- escolhendo o conjugado, a concentração e a dose de luz correcta é possível diminuir em mais de um milhão de vezes (seis log) a sobrevivência das várias bactérias. Desta forma, estirpes multirresistentes a antibióticos podem ser facilmente destruídas como as estirpes nativas.

Em resumo, a acumulação da porfirina **11** nas células e a sua conseqüente fototoxicidade, no caso das células Gram-negativas, depende directamente da sua ligação à polilisina e do número de cargas que esta transporta consigo. Enquanto que as cargas positivas do fármaco permitem uma ligação às cargas negativas da superfície bacteriana, aumentando deste modo a acumulação, as cadeias de polipeptídeos permitem perturbar, suficientemente, a barreira de lipopolissacarídeos constituintes da membrana exterior das células Gram-negativas, tornando-a permeável ao fotossensibilizador.



## 2.4 Conclusões

A primeira parte do trabalho consistiu na síntese e caracterização dos compostos porfirínicos a estudar. É de realçar a preparação de polímeros de lisina contendo unidades de porfirina.

Na segunda parte deste trabalho efectuámos estudos biológicos com os compostos sintetizados. Os resultados obtidos mostraram-nos a importância da polilisina na acumulação do fotossensibilizador nas células Gram-negativas, sendo esta mesmo necessária para a fotoinactivação deste tipo de células por PDT.

Alguns dos resultados biológicos agora apresentados são bastante interessantes e animadores, no que diz respeito à inibição das bactérias estudadas. Assim, o conjugado porfirina-polilisina **15** apresenta-se como um potencial antibiótico artificial de largo espectro, podendo controlar infecções bacterianas. Além disso, verificou-se que a PDT é uma nova técnica que poderá ser usada na inactivação de bactérias bastante resistentes como, por exemplo, a *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, como já foi dito, os estudos de PDT com estes compostos devem continuar, variando os vários factores que nestes estudos preliminares foram mantidos fixos, como por exemplo o tempo de incubação, de irradiação, a potência de luz, ou seja, determinar a metodologia ideal para obter os melhores resultados possíveis. Estudos mais aprofundados só se justificam nos compostos com maiores potencialidades, até porque são ensaios bastante onerosos.

Alguns dos compostos estudados podem ser considerados como candidatos, bastante promissores, a agentes antimicrobianos, quer como antissépticos ou como antibióticos. Os resultados obtidos, permitem-nos ainda delinear novas rotas de síntese de porfirinas mais selectivas para estas bactérias ou outras.

## 2.5 Parte experimental da síntese

### 2.5.1 Reagentes, solventes e equipamento

Os reagentes comerciais, de diversas marcas, foram usados sem qualquer purificação prévia uma vez que os seus graus de pureza assim o permitiam.

Os solventes utilizados nas transformações e cristalizações efectuadas eram analiticamente puros ou foram, sempre que necessário, purificados:

- a dimetilformamida foi seca com sulfato de magnésio anidro;
- o dimetilsulfóxido foi seco, por aquecimento a refluxo, sobre hidreto de cálcio e destilado em seguida a pressão normal;
- a piridina foi seca, por aquecimento a refluxo, sobre lentilhas de hidróxido de sódio e destilada em seguida;
- o tolueno foi seco com fio de sódio e passado por alumina neutra activada, imediatamente antes de ser utilizado.

Os solventes utilizados nas operações de purificação foram previamente destilados e passados, antes de serem usados, por uma coluna de alumina neutra activada.

A evolução das reacções foi seguida por TLC, usando pequenas folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60. Algumas cromatografias de camada fina, depois da eluição dos compostos, foram observadas à luz ultravioleta a 254 ou 366 nm;

Nas cromatografias de coluna utilizou-se sílica gel 60, da Merck, de granulometria 70-230 mesh.

As cromatografias de camada fina preparativas foram efectuadas em placas de vidro, previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 (Merck), com uma espessura de 0,5 mm, e activadas na estufa a 100 °C durante 8 horas.

Os espectros de RMN foram registados num aparelho Bruker AMX 300. Os solventes deuterados utilizados são referenciados em cada espectro. Como padrão interno foi usado o TMS ( $\delta = 0$  ppm).

Os espectros de massa em FAB (positivo) foram registados num espectrómetro VG AutoSpecQ, utilizando como matrizes o álcool 3-nitrobenzílico (NBA) e o tioglicerol.

Os espectros de massa de alta resolução e as microanálises elementares foram efectuadas no Instituto du Pin (Bordéus).

Os espectros de ultravioleta-visível foram registados num espectrofotómetro Jasco V-560.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de placa aquecida Reichert Thermovar e não foram corrigidos.

## 2.5.2 Síntese de porfirinas ligadas à polilisina

### 2.5.2.1 Síntese de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina

A uma mistura de ácido acético glacial (200 mL) e nitrobenzeno (150 mL) em refluxo, adicionou-se ácido 4-formilbenzóico (1,27 g, 8,46 mmol, 1,2 eq.) e piridina-4-carbaldeído (2,00 mL, 20,9 mmol, 2,9 eq.). Após a dissolução do ácido 4-formilbenzóico, adicionou-se o pirrol (2,00 mL, 28,9 mmol, 4 eq.), gota a gota, com a ajuda de um funil de carga. A mistura foi refluxada durante 1 hora. Findo esse tempo deixou-se arrefecer e quando o banho de óleo se encontrava a 40 °C iniciou-se a destilação, a pressão reduzida, do ácido acético glacial e do nitrobenzeno até à secura. O resíduo foi retomado em clorofórmio/metanol (85:15) e separado por cromatografia rápida de coluna usando como eluente clorofórmio/metanol (85:15). Com este eluente obteve-se uma primeira fracção que foi identificada como sendo a 5,10,15,20-tetra(4-piridil)porfirina (93 mg, 3%). A segunda fracção recolhida da coluna correspondia à porfirina **1**. Esta, após remoção do solvente, foi recristalizada em clorofórmio/metanol (85:15)/acetona e deu origem a cristais de cor vermelha (257 mg, 6%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ: 8.12 (d, *J*= 4.8 Hz, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 8.25 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H, 15-Ar-*o*-H), 8.28 (d, *J*= 7.8 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.50 (d, *J*= 7.8 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.65-8.91(m largo, 12H, 10,20-Ar-*m*-H e β-H), 9.02 (d, *J*= 5.7 Hz, 2H, 15-Ar-*m*-H); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ: 116.9, 117.2, 120.4, 128.1, 129.5, 130.7, 134.3, 145.7, 147.6, 150.4, 169.2 (CO<sub>2</sub>H); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 71.75; H, 3.96; N, 13.88; Calculado para C<sub>42</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: C, 72.30; H, 4.48; N,

14.05; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em DMSO: 418 (5.61), 513 (4.30), 546 (3.79), 587 (3.78), 642 (3.48); **EM FAB<sup>+</sup>** m/z: 662 (M+H)<sup>+</sup>

O procedimento para a síntese de **2** foi idêntico ao de **1** mas em vez de se usar o ácido 4-formilbenzóico, usou-se o 4-formilbenzoato de metilo (1,39 g; 8,46 mmol; 1,2 eq).

Após a destilação, retomou-se o resíduo em clorofórmio e cromatografou-se numa coluna de sílica, usando como eluente clorofórmio. Obtiveram-se essencialmente duas fracções, ambas constituídas por vários compostos com semelhantes  $R_f$ .

Da primeira fracção, após exaustiva separação usando pequenas colunas de sílica de placa sob vazio e placas de TLC preparativas, usando clorofórmio como eluente, foram isolados quatro compostos. O menos polar correspondia à 5,10,15,20-tetraquis(4-metoxycarbonilfenil)porfirina (21 mg, 1%); o seguinte era a 5,10,15-tris(4-metoxycarbonilfenil)-20-(4-piridil)porfirina (110 mg, 5%); os dois últimos correspondiam ao par de isómeros 5,15-bis(4-metoxycarbonilfenil)-10,20-di(4-piridil)porfirina (62 mg, 2%) e 5,10-bis(4-metoxycarbonilfenil)-15,20-di(4-piridil)porfirina (145 mg, 5%).

Da segunda fracção da coluna, após exaustiva separação por cromatografia rápida em pequenas colunas de sílica, usando clorofórmio como eluente, foram isolados dois compostos: a *meso*-tetrapiridilporfirina (15 mg, 0,5%) e a 5-(4-metoxycarbonilfenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (**2**) (177 mg, 4%).

Dados espectroscópicos de:

5,10,15,20-tetraquis(4-metoxycarbonilfenil)porfirina, **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -2.82 (s, 2H, NH), 4.11 (s, 12H, COOCH<sub>3</sub>), 8.30 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 8H, Ar-*o*-H), 8.45 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 8H, Ar-*m*-H), 8.82 (s, 8H,  $\beta$ -H); **EM FAB<sup>+</sup>**: 847 (M+H)<sup>+</sup>

5,10,15-tris(4-metoxycarbonilfenil)-20-(4-piridil)porfirina, **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -2.85 (s, 2H, NH), 4.12 (s, 9H, COOCH<sub>3</sub>), 8.19 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 2H, 20-Ar-*o*-H), 8.29 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 6H, 5,10,15-Ar-*o*-H), 8.46 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 6H, 5,10,15-Ar-*m*-H), 8.82-8.87 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.04 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 2H, 20-Ar-*m*-H); **EM FAB<sup>+</sup>**: 790 (M+H)<sup>+</sup>

5,15-bis(4-metoxycarbonilfenil)-10,20-di(4-piridil)porfirina, **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.88 (s, 2H, NH), 4.12 (s, 6H,  $\text{COOCH}_3$ ), 8.17 (d,  $J = 5.9$  Hz, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 8.30 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, 5,15-Ar-*o*-H), 8.47 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, 5,15-Ar-*m*-H), 8.83-8.87 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.05 (d,  $J = 5.9$  Hz, 4H, 10, 20-Ar-*m*-H); **EM FAB $^+$** : 733 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

5,10-bis(4-metoxycarbonilfenil)-15,20-di(4-piridil)porfirina: **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.87 (s, 2H, NH), 4.12 (s, 6H,  $\text{COOCH}_3$ ), 8.16 (d,  $J = 5.3$  Hz, 4H, 15,20-Ar-*o*-H), 8.30 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, 5,10-Ar-*o*-H), 8.46 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, 5,10-Ar-*m*-H), 8.83-8.87 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.05 (d,  $J = 5.3$  Hz, 4H, 15, 20-Ar-*m*-H); **EM FAB $^+$** : 733 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

5-(4-metoxycarbonilfenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (**2**): **p.f.**:  $>300$  °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.90 (s, 2H, NH), 4.12 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 8.17 (d,  $J = 6.0$  Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.47 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.84-8.87 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.05-9.07 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **EM FAB $^+$** : 676 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

### Hidrólise da 5-(4-metoxycarbonilfenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (**2**)

Uma solução da porfirina **2** (40,0 mg, 59,2  $\mu\text{mol}$ ) em THF (1 mL) e piridina (0,2 mL) foi tratada com hidróxido de potássio (1,0 g, 17,8 mmol) dissolvido em metanol (10 mL) e a mistura foi agitada durante 3 horas a 60 °C. Com o produto totalmente precipitado verificou-se por TLC que toda a porfirina de partida tinha sido hidrolisada. Filtrou-se o precipitado, sendo esse então retomado em clorofórmio/metanol (85:15), neutralizado com uma pequena quantidade de uma solução saturada de ácido cítrico e lavado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e após concentração a pressão reduzida, o produto (37 mg, 94%) foi obtido puro por cristalização em clorofórmio/metanol (85:15)/éter de petróleo.

### 2.5.2.2 Estudos de optimização das condições de acoplamento

#### 2.5.2.2.1 Activação do grupo carboxílico

##### a) Via *N,N'*-díciclo-hexilcarbodiimida (DCC)

A porfirina **4** foi obtida aquando da reacção da porfirina **1** com a lisina esterificada ou com a *N*-hidroxi-succinimida, usando para o efeito o activante *N,N'*-díciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e a 4-pirrolidinopiridina como catalizador, em DMSO. No primeiro caso a reacção decorreu à temperatura ambiente durante uma noite, não havendo formação do produto pretendido, mas sim e apenas, a ureia **4**, não tendo no entanto a reacção sido completa. No segundo caso a porfirina **4** foi apenas um produto secundário da reacção, que decorreu a 40 °C durante 24 horas. O produto foi então separado por coluna de sílica, cristalizado em clorofórmio/éter de petróleo. Apesar de se ter podido determinar o rendimento do produto, este não foi determinado uma vez que não se trataram de reacções programadas para o obter. **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.90 (s, 2H, NH), 1.15-2.18 (m, 20H, CH<sub>2</sub>), 3.65-3.78 (m, 1H, CONHCH), 4.37-4.45 (m, 1H, CONCH), 6.27 (d, *J*= 7.5 Hz, 1H, NH), 8.01 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.16 (d, *J*= 5.6 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.27 (d, *J*= 8.0 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.82-8.87 (m, 8H, β-H), 9.06 (d, *J*= 5.6 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 868 (M+H)<sup>+</sup>

##### b) Via *N*-hidroxi-succinimida

A uma solução da porfirina **1** (51,0 mg, 77,1 μmol) em piridina seca (5 mL) adicionou-se, lentamente, cloreto de tionilo (100 μL, 163 mg, 1,37 mmol, 17,8 eq.). A mistura foi agitada durante 30 minutos a 50 °C, e protegida da humidade por um tubo de sílica gel. Uma vez formado o cloreto de acilo, confirmado por TLC, adicionou-se à mistura anterior *N*-hidroxi-succinimida (200 mg, 1,74 mmol, 22,6 eq.), mantendo-a em agitação durante mais 3 horas a 50 °C. A piridina foi evaporada a pressão reduzida, e o resíduo sólido, depois de retomado em clorofórmio, foi lavado com uma solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e

após concentração a pressão reduzida, o produto foi cristalizado em clorofórmio/éter de petróleo originando cristais vermelho escuros correspondendo à porfirina **5** (53,2 mg, 91%). **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.90 (s, 2H, NH), 3.03 (s largo, 4H, CH<sub>2</sub>), 8.17 (d, *J*= 5.9 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.37 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.57 (d, *J*= 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.84-8.89 (m, 8H, β-H), 9.07 (d, *J*= 5.9 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 25.7 (2 x CH<sub>2</sub>), 117.6, 117.7, 119.1, 124.8, 129.1, 129.3, 131.4, 134.8, 148.3, 148.4, 149.8, 161.9 (COON), 169.3 (CON); **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 759 (M+H)<sup>+</sup>

### c) Síntese da porfirina **6**

O produto **6** formou-se durante os processos de extracção e purificação do éster activo **5**, quando se utilizou metanol. Ao concentrar-se a fase orgânica no evaporador rotativo (±50 °C) para posterior cristalização, verificou-se por TLC que o concentrado passara a exibir, não uma mancha mas sim três. Assim para além do produto **5** haviam-se formado dois novos compostos, o **2** menos polar que o **5** e o **6** mais polar que a anterior. O composto **6** foi separado dos anteriores por TLC usando clorofórmio/acetona (1:1) como eluente e cristalizado em clorofórmio/éter de petróleo. O rendimento do produto **6** não foi determinado uma vez que não se tratou de uma reacção programada para o obter, ou seja não deixamos a reacção evoluir no sentido de o formar. Só dessa forma a determinação do rendimento faria sentido. **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.89 (s, 2H, NH), 2.87-2.91 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 8.14-8.18 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.34 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.56 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.84-8.88 (m, 8H, β-H), 9.05 (t, *J*= 6.0 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H), 11.00 (s largo, 1H, ONHCO); **EM FAB<sup>+</sup>**: 791 (M+H)<sup>+</sup>;

### 2.5.2.2.2 Acoplamento da porfirina activada **5** ao éster metílico da glicina e à lisina

#### a) Síntese da porfirina **7**

A uma solução da porfirina **5** (10 mg, 13,2  $\mu\text{mol}$ ) em DMSO seco (3 mL) adicionou-se glicinato de metilo (4,5 mg, 35,8  $\mu\text{mol}$ , 2,7 eq.). Manteve-se a mistura em agitação no escuro à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto. A reacção foi seguida por TLC e ao fim de aproximadamente 16 horas, verificou-se que a reacção tinha sido completa. Evaporou-se o DMSO à secura e retomou-se o resíduo em clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com água e seca por sulfato de sódio anidro. O produto (9,3 mg, 96%) foi obtido puro por cristalização em clorofórmio/metanol. **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.90 (s, 2H, NH), 3.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.46 (d,  $J$ = 4.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.06 (t,  $J$ = 4.8 Hz, 1H, NH), 8.14-8.17 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.24 e 8.31 (2d,  $J$ = 8.1 Hz, 4H, 5-Ar-H), 8.83-8.86 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.04-9.07 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **EM FAB $^+$** : 733 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

#### b) Síntese do dímero **10**

Procedimento idêntico ao realizado para a obtenção da porfirina **7**.

A uma solução da porfirina **5** (50 mg, 65,9  $\mu\text{mol}$ ) em DMSO seco (10 mL) adicionou-se lisina (31,0 mg, 170  $\mu\text{mol}$ , 2,6 eq.) e trietilamina (1 mL). A mistura reaccional foi mantida em agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e ao abrigo da luz. Ao fim de 20 horas verificou-se por TLC que a reacção estava completa. Evaporou-se o DMSO à secura e retomou-se o resíduo em clorofórmio/metanol (85:15), a fase orgânica foi lavada com água, seca por sulfato de sódio anidro e concentrada no evaporador rotativo. O resíduo foi cromatografado em coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio/metanol (70:30). O dímero obtido (45 mg, 95 %) foi cristalizado em clorofórmio/metanol com formação de cristais castanho escuros. **p.f.**: >300  $^\circ\text{C}$ ; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : -3.03 (s, 4H, NH), 1.90-2.04 e 2.19-2.45 (2m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 4.90 (s largo, 1H, CH-lisina), 7.65-7.72 (m, 8H, 5-Ar-*o*- e *m*-H), 8.16-9.01 (m largo, 42H, 10,15,20-Ar-*o*-, *m*-H,  $\beta$ -H e NH-lisina); **EM FAB $^+$** : 1433 ( $\text{M}+2\text{H}$ ) $^+$



### 2.5.2.3 Metilação dos compostos 1, 5 e do dímero 10

#### a) Síntese do triiodeto de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina

A uma suspensão da porfirina **1** (50,0 mg, 75,6  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (10 mL), adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (2 mL, 32,1 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 3 horas a 40 °C num balão equipado com condensador. Terminado este período arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado e lavou-se muito bem com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vazio tendo-se obtido um pó castanho escuro (80 mg, 97%). **p.f.**: >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : -3.03 (s, 2H, NH), 4.71 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 8.26 (d,  $J$ = 8.2 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.39 (d,  $J$ = 8.2 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.98-9.15 (m, 14H, 10,15,20-Ar-*o*- e  $\beta$ -H), 9.47 (d,  $J$ = 6.3 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **Análise elementar**: Encontrado (%): C, 47.33; H, 3.87; N, 8.54; Calculado para  $\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{I}_3\text{N}_7\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C, 47,35; H, 3,71; N, 8,59; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em DMSO: 425 (5.34), 518 (4.28), 551 (3.95), 589 (3.92), 644 (3.62), e em PBS: 422 (5.37), 520 (4.20), 559 (3.84), 584 (3.84), 642 (3.41); **EM FAB $^+$**   $m/z$ : 706 ( $\text{M}-3\text{I}$ ) $^+$

#### b) Síntese do triiodeto de 5-(4-*N*-hidroxi-succinimidilcarbonilfenil)-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (**12**)

Procedimento idêntico ao anterior. A uma suspensão da porfirina **5** (75,0 mg, 98,8  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (15 mL), adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (3 mL, 48,1 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 3 horas a 40 °C num balão equipado com condensador. Terminado este período arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por um funil com algodão e lavou-se muito bem com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O

produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vazio obtendo-se um pó castanho escuro (107 mg, 91.4 %). **RMN  $^1\text{H}$**  (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$ : -3.05 (s, 2H, NH), 3.02 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.71 e 4.72 (2s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 8.51 (d,  $J$ = 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.60 (d,  $J$ = 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.99-9.10 e 9.18 (1m e 1s largo, 14H, 10,15,20-Ar-*o*- e  $\beta$ -H), 9.48 (d,  $J$ = 5.8 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **EM FAB $^+$** : 803 (M-3I) $^+$

### c) Metilação do dímero 10

A uma suspensão do dímero **10** (25,0 mg, 17,5  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (5 mL), adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (1 mL, 16,1 mmol). Apesar do reagente de partida ser insolúvel em DMF, ao fim de pouco tempo de reacção com o iodeto de metilo, mesmo à temperatura ambiente, ele acaba por se dissolver pois o produto da reacção é solúvel. A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 7 horas a 40 °C (para ter a certeza de que todos os grupos piridilo ficavam metilados), num balão equipado com condensador. Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por um funil com algodão e lavou-se muito bem com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vazio para dar um pó castanho escuro (38 mg, 95%). **RMN  $^1\text{H}$**  (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$ : -3.03 (s, 4H, NH), 1.65-1.90 (1m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.95-2.19 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.48-3.60 (m, 1H, CH-lisina), 4.71 e 4.72 (2s, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 8.33-8.45 (m, 8H, 5-Ar-*o*- e *m*-H), 8.98-9.17 (m, 30H, 10,15,20-Ar-*o*-H,  $\beta$ -H e NH-lisina), 9.48 (d,  $J$ = 6.2 Hz, 12H, 10,15,20-Ar-*m*-H)

### 2.5.2.4 Acoplamento das porfirinas 1 e 11 a polilisina com 1 a 4 KD

#### a) Reacção do éster activado 5 a polilisina

Dissolveu-se a polilisina (29 mg, correspondente a cerca de 0,20 mmol de aminoácidos, 6,2 eq. de terminais  $\text{NH}_2$ ) em DMSO seco (19 mL) e trietilamina (0,5 mL).

A porfirina **5** (24,0 mg, 31,7  $\mu\text{mol}$ ) dissolvida em DMSO seco (10 mL) foi adicionada, gota a gota, à solução anterior. A mistura reaccional foi deixada a agitar a 40 °C sob atmosfera de azoto. A reacção foi monitorizada por TLC e ao fim de 24 horas verificou-se que quase toda a porfirina tinha sido consumida, dando-se a reacção por terminada.

A solução resultante foi transferida para uma manga de diálise (cut off: 1000 D) e dialisou-se durante dois dias: primeiro durante cerca de 10 horas contra um gradiente de [ácido clorídrico 1% (v/v)/metanol (1:1)]/DMSO e as restantes 38 horas contra uma mistura de ácido clorídrico 1% (v/v)/metanol (1:1) (3 x 300 mL). Desta forma foi removida a porfirina livre e trocado o DMSO por ácido clorídrico 1% (v/v)/metanol (1:1). Da análise do retentato por espectroscopia de ultravioleta confirmou-se a troca de solventes, uma vez que o espectro não apresentava nenhum sinal a 206 nm ( $\lambda_{\text{máx.}}$  do DMSO).

A manga de diálise foi cortada e a solução transferida para um balão de fundo redondo e concentrada, até um pequeno volume, a pressão reduzida sem ultrapassar os 35 °C. A solução concentrada adquiriu uma cor verde intensa, foi transferida para um porta amostras de plástico e congelada em azoto líquido. A liofilização do produto **14** deu origem a um sólido floculoso verde escuro (25,5 mg, 48%)

### **b) Reacção do éster activado metilado 12 a polilisina**

Este polímero preparou-se de modo semelhante ao anterior, mas aqui a reacção decorreu durante 3 dias e não foi totalmente completa, como a anterior.

Dissolveu-se a polilisina (64 mg, cerca de 0,44 mmol de aminoácido, 6,5 eq. de terminais  $\text{NH}_2$ ) em DMSO seco (50 mL) e trietilamina (1,5 mL). A porfirina **5** (80,0 mg, 67,6  $\mu\text{mol}$ ) dissolvida em DMSO seco (14 mL) foi adicionada, gota a gota, à solução anterior. A mistura reaccional foi deixada a agitar a 40 °C sob atmosfera de azoto. Ao fim de 24 horas verificou-se por TLC que a reacção ainda não havia sido completa. 48 horas depois a reacção ainda não estava completa. Mesmo assim deu-se a reacção por terminada.

A solução resultante foi transferida para uma manga de diálise (cut off: 1000 D) e dialisou-se durante dois dias: primeiro durante cerca de 10 horas contra um gradiente de

[ácido clorídrico (1% v/v)/metanol (1:1)]/DMSO, e as restantes 38 horas contra uma mistura de ácido clorídrico (1% v/v)/metanol (1:1) (3 x 300 mL). Desta forma, foi removida a porfirina livre e trocado o DMSO por ácido clorídrico (1% v/v)/metanol (1:1). Da análise do retentato por espectroscópica de ultravioleta confirmou-se novamente a troca de solventes.

A manga de diálise foi cortada e a solução transferida para um balão e concentrada, até um pequeno volume, a pressão reduzida sem ultrapassar os 35 °C. A solução concentrada adquiriu uma cor verde intensa, foi transferida para um porta amostras de plástico e congelada em azoto líquido. A liofilização do produto **15** deu origem a um sólido floculoso verde escuro (68,0 mg, 47%).

### c) Metilação total do polímero não-catiónico

Dissolveu-se a polilisina (26 mg) em DMSO seco (16 mL) e trietilamina (0,5 mL). A porfirina **5** (21,0 mg, 27,7 µmol) dissolvida em DMSO seco (10 mL) foi adicionada, gota a gota, à solução anterior. A mistura reaccional foi deixada a agitar a 40 °C sob atmosfera de azoto durante 24 horas. Em seguida, e sem qualquer purificação, adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (3 mL) e aqueceu-se durante 7 horas a 40 °C num balão equipado com condensador. Terminado este período, após arrefecer, a mistura foi transferida para uma manga de diálise (cut off: 1000 D) e dialisada durante dois dias: primeiro durante cerca de 10 horas contra um gradiente de ácido clorídrico 1% (v/v)/DMSO, e as restantes 38 horas contra ácido clorídrico 1% (v/v) (3 x 300 mL). Desta forma purificou-se o polímero e trocou-se o DMSO por ácido clorídrico 1% (v/v). Da análise do retentato por espectroscopia de ultravioleta confirmou-se a ausência de DMSO, ou seja, a 206 nm,  $\lambda_{\text{máx.}}$  do DMSO, não surgiu nenhum sinal.

A manga de diálise foi cortada e a solução transferida para um balão e concentrada, até um pequeno volume, a pressão reduzida e sem ultrapassar os 35 °C. A solução concentrada adquiriu uma cor verde intensa, foi transferida para um porta amostras de plástico e congelada em azoto líquido. A liofilização do produto **16** deu origem a um sólido floculoso verde escuro (21,5 mg, 46%).

## **2.6 Parte experimental dos ensaios biológicos**

### **2.6.1 Meios, reagentes, solventes, material e equipamento utilizados**

O meio “Brain Heart Infusion” (BHI) utilizado para a cultura das bactérias e para a manutenção das linhas bacterianas era um produto da Decton Dickinson. O meio foi preparado dissolvendo 13 g de BHI em 350 mL de água bidestilada (milli-Q).

O terreno sólido (BHA) foi obtido adicionando 5,25 g (1,5% (m/v)) de Agar Bacto<sup>TM</sup> da Decton Dickinson à solução anterior.

O tampão fosfato salino (PBS), sem cálcio e sem magnésio, foi preparado pela dissolução de cloreto de sódio (8 g/L), cloreto de potássio (0,2 g/L), hidrogenofosfato de sódio (1,44 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O), di-hidrogenofosfato de potássio (0,2 g/L) em água bidestilada.

Os meios de cultura e o PBS foram distribuídos em frascos de 250 mL e esterilizados em autoclave (120 °C durante 20 minutos). O material plástico em geral era estéril e o que não era foi também esterilizado. Para além disso, fez-se o teste de esterilidade aos tubos universais já com BHI, que serviram para recolher e lavar as bactérias, e às placas de Petri com meio BHA, onde depois foram semeadas as bactérias.

Todos os outros reagentes e solventes eram produtos comerciais, pelo menos, de grau analítico.

Todo o material e meios contaminados depois de utilizados foram autoclavados, para destruição dos seres patogénicos, e embalados para posterior destruição.

A água utilizada na preparação dos meios, foi purificada por um equipamento Millipore, modelo Milli-Q<sup>®</sup>.

O ambiente estéril necessário para a realização do trabalho com as bactérias foi criado no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical, da Gelaire, Flow laboratories, modelo TC48.

A fonte de energia da Teclas, modelo Source PTL-Penta, utilizada na irradiação, encontrava-se ligada a um estabilizador de corrente. A fonte era constituída por uma lâmpada de halogéneo de 250 W da Osram, na qual seleccionámos o filtro de luz branca acoplado. O feixe de luz foi focado por intermédio de um feixe de fibras ópticas. A potência de radiação na extremidade da fibra foi aferida e determinada através dum potenciómetro luminoso Scientech 373 Power and Energy Meter.

Os espectros de visível foram registados num espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Lambda 2.

Os espectros fluorimétricos foram registados num espectrómetro de fluorescência Perkin Elmer, modelo MPF4, equipado com fototubo sensível ao vermelho. Os espectros foram obtidos em soluções de SDS a 2% à temperatura ambiente.

### **2.6.2 Material porfirínico e células bacterianas**

Os compostos **1** e **11** e os polímeros **14**, **15**, **16** foram sintetizados, purificados e caracterizados por nós e foram usados assim nos ensaios biológicos.

Os compostos **1** e **14** foram dissolvidos, respectivamente, em DMSO e em DMSO com 10% de água. Os catiónicos **11**, **15** e **16** foram dissolvidos em PBS. A concentração das soluções dos polímeros refere-se à concentração de fotossensibilizador existente em solução, e foi determinada a partir da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da banda Soret da porfirina de partida **1**, no caso do polímero **14**, ou da porfirina **11**, no caso dos dois polímeros catiónicos **15** e **16**.

A partir das soluções “stock”, mantidas no frigorífico e protegidas da luz, foram preparadas todas as outras mais diluídas, por adição exclusiva de PBS.

As linhas celulares foram mantidas a 4 °C em placas de Petri contendo meio sólido (BHA). De mês a mês, pelo menos, uma colônia era transferida para uma nova placa de Petri.

Um dia antes de efectuar os testes biológicos era necessário semear numa placa de Petri pequena uma colônia da placa de linha. Depois de semeadas, as bactérias eram incubadas a 37 °C durante cerca de 16 horas (uma noite) com a placa invertida. Aqui, com a ajuda de uma zaragatoa de algodão estéril, as bactérias foram recolhidas e transferidas para um tubo com BHI (20 mL) a 37 °C, ao qual, previamente se tinha feito o teste de esterilidade (deixava-se na incubadora durante a noite, e se o meio se mantivesse transparente é porque estava estéril e preparado para receber as bactérias produzidas). Depois de recolhidas no tubo, as bactérias foram então sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos e lavadas duas vezes, mediante sucessivas centrifugações e ressuspensões numa solução salina de fosfatos estéril e tamponada a pH=7,4 (10 mL).

Depois da lavagem, o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em 2 ou 3 mL de PBS estéril.

Determinação da concentração de bactérias em suspensão: A concentração de células bacterianas existente nessa suspensão foi determinada pela densidade óptica (DO) a 650 nm, de uma suspensão celular diluída de modo a obter uma absorvência igual a 0,7 correspondendo a uma concentração celular de  $10^8$ - $10^9$  (isto é, cerca de  $5 \times 10^8$ ) células/mL. Esta diluição foi obtida adicionando pequenos volumes de PBS a um determinado volume, conhecido, de suspensão bacteriana.

Determinada a concentração de bactérias obtidas, preparou-se 5 mL de uma nova suspensão com uma concentração igual a cerca de  $5 \times 10^8$  células/mL, agora usando o volume de PBS determinado na primeira DO, mas confirmando novamente a absorvência a 650 nm. Esta foi diluída para aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/mL, ou seja, 2 mL da suspensão anterior mais 3 mL de PBS estéril. Foi esta suspensão, com uma concentração de cerca de  $2 \times 10^8$  células bacterianas por mililitro que usámos nos nossos testes. Sendo a concentração bacteriana nos testes aproximadamente de  $10^8$  células/mL, uma vez que se usou igual volume das diferentes solução das concentrações de fotossensibilizadores e de suspensão de bactérias, para o pré-tratamento das bactérias com droga.

### 2.6.3 Estudos de fotoestabilidade dos compostos

Preparou-se, para cada porfirina a estudar, uma solução de concentração 1  $\mu\text{M}$  em PBS. Dois mililitros de cada uma das soluções anteriores foram irradiados, numa célula de quartzo com luz branca de igual potência ( $50 \text{ mW/cm}^2$ ) à usada na fotoinativação das bactérias. Durante a irradiação a solução foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente.

Os espectros de visível das soluções foram registados entre os 350 e os 750 nm, nos tempos de irradiação preestabelecidos, até perfazer 30 minutos de irradiação.

A fotoestabilidade dos compostos foi determinada por comparação da intensidade da banda Soret com a observada ao fim de cada período de irradiação e é apresentada em percentagem, relativamente ao tempo zero de irradiação (0% de porfirina degradada).

### 2.6.4 Estudos de fotoinativação de bactérias na presença dos derivados porfirínicos

Todos os ensaios foram realizados com cerca de  $10^8$  células/mL, com as diferentes concentrações de droga.

As células foram incubadas durante 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Findo este tempo foram irradiadas durante 30 minutos com luz branca de potência igual a  $50 \text{ mW/cm}^2$ .

Depois de semeadas em placas de Petri com meio BHA, as bactérias foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas, com as placas invertidas. Cada bactéria viável deu origem a uma colónia, que corresponde a uma unidade formadora de colónia (UFC).

Para cada suspensão de bactérias foram feitos controlos, semeando-se duas diluições apropriadas (100  $\mu\text{L}$ ) de bactérias que não tiveram qualquer contacto com droga.

O resultados da inativação no escuro e à luz foram também determinados pelo método da sementeira em placas. Semearam-se determinados volumes de suspensão bacteriana ou diluições apropriadas destas para as diferentes concentrações de fotossensibilizador e determinou-se o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL).



Enquanto que os resultados obtidos no escuro indicam a toxicidade da droga nas diferentes concentrações (isto é, a susceptibilidade bacteriana), os resultados obtidos com irradiação indicam a soma da susceptibilidade com o efeito da luz.

Os ensaios foram repetidos, pelo menos em duplicado (duas experiências independentes), e os resultados que apresentamos são a média dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos nas experiências foram confrontados então com os controles (100% de sobrevivência) e determinou-se assim a relação de sobrevivência das células nos diferentes ensaios. Os resultados vêm expressos em percentagem de sobrevivência bacteriana.

### **2.6.5 Determinação da quantidade de fotossensibilizador ligado às células**

Em tubos universais prepararam-se, em duplicado, diferentes concentrações de droga em PBS. A cada um deles adicionaram-se bactérias de modo a obter uma quantidade final de  $10^8$  células/mL. As suspensões resultantes foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso em SDS a 2% (500  $\mu$ L). O lisado bacteriano foi guardado a  $-30$  °C até se proceder à dosagem do fotossensibilizador e das proteínas.

De cada tubo foram retiradas duas alíquotas de 50  $\mu$ L: uma serviu para determinar a quantidade de fotossensibilizador ligado as células e a outra para dosear as proteínas celulares.

Na determinação da quantidade de fotossensibilizador ligado às células não foram feitos controlos, nos quais as células não eram tratadas com droga, porque a toxicidade no escuro era bastante baixa para todas as concentrações das drogas testadas, não havendo por isso perda de proteína celular com o sobrenadante, que se despreza após centrifugação das bactérias, devido a uma eventual destruição celular.

Aqui cabe lembrar que no final deste estudo cada experiência (isto é, cada tubo) deve conter proteína bacteriana suficiente para a sua determinação. Assim, é necessário iniciar-se com pelo menos  $20 \times 10^8$  células. Como os testes de inactivação foram realizados

a uma concentração de bactérias igual a  $10^8$  células/mL, foi necessário preparar 20 mL de cada concentração de droga mais células.

A quantificação do fotossensibilizador nos diferentes lisados foi determinada por espectrofluorimetria. Para isso, diluiu-se cada uma das alíquotas anteriores em SDS a 2% para uma concentração adequada de modo a que a fluorescência registada estivesse dentro da sensibilidade da técnica. Os espectros de fluorescência foram registados no intervalo entre 600-800 nm com excitação a 420 nm (comprimento de onda da banda Soret). A intensidade de fluorescência obtida resulta da soma das intensidades dos dois picos máximos de emissão. Por interpolação de uma recta de calibração realizada para **11**, as intensidades de fluorescência foram convertidas em concentrações de fotossensibilizador.

O doseamento de proteína bacteriana foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Este método baseia-se na redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , em meio alcalino.

Para isso prepararam-se duas soluções reagente, contendo:

- solução A: bicinconinato de sódio (1 g), carbonato de sódio (2 g), hidrogenocarbonato de sódio (0,95 g), tartarato de sódio (0,16 g) e hidróxido de sódio (0,4 g), em 100 mL de água. O pH foi ajustado a 11,25 com NaOH 10M.
- solução B: sulfato de cobre penta-hidratado (0,4 g) em 10 mL de água.

Misturando 50 partes de A com uma de B, obteve-se a mistura reagente “standard” a usar.

Procedimento utilizado:

- Adicionou-se 1 mL da mistura reagente a cada alíquota (50  $\mu\text{L}$ ) e agitou-se muito bem deixando-se a incubar durante 30 minutos a 37 °C.
- Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e mediu-se a absorvência a 562 nm, contra o branco obtido da incubação de 50  $\mu\text{L}$  de SDS a 2% e 1 mL da mistura reaccional.
- Realizou-se uma recta de calibração, usando soluções de albumina bovina, de concentrações conhecidas, submetidas aos mesmos tratamentos.
- A quantidade de proteína em cada amostra foi determinada por interpolação dessa recta de calibração. As absorvências foram assim convertidas em concentrações de proteína (mg/mL).

Os resultados da quantidade de fotossensibilizador ligado às células vêm expressos em nanomoles de fotossensibilizador por miligrama de proteína.

## 2.7 Referências

1. M. J. Pelczar Jr., E. C. S. Chan, N. R. Krieg, “Microbiologia - Conceitos e Aplicações”, Makron Books, São Paulo, **1997**, vol. 2, cap. 21, pag. 111.
2. H. Mendonça, “Diário de Notícias”, **16-01-2001**, pag. 23.
3. R. K. Pandey, G. Zheng, “The Porphyrin Handbook - Applications: Past, Present and Future”, K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guillard (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **2000**, vol. 6.
4. Z. Malik, H. Ladan, B. Ehrenberg, Y. Nitzan, “Photodynamic Therapy - Basic Principles and Clinical Application”, B. W. Henderson, T. J. Dougherty (Ed), Marcel Dekker, Nova Iorque, **1992**, cap. 8, pag. 97.
5. R. Bonnett, “Chemical Aspects of Photodynamic Therapy”, Gordon and Breach Science Publishers, Londres, **2000**, cap. 14, pag. 278.
6. N. S. Soukos, L. A. Ximenez-Fyvie, M. R. Hamblin, S. S. Socransky, T. Hasan, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1998**, 42, 2595.
7. G. Jori, D. Tonlorenzi, *Photodynamics News*, **1999**, 2, num. 1.
8. F. B. Vical, A. Robert, B. Meunier, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2000**, 44, 2836.
9. J. North, H. Neyndorff, J. G. Levy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1993**, 17, 99.
10. S. A. Priola, A. Raines, W. S. Caughey, *Science*, **2000**, 287, 1503.
11. G. Jori, C. Perria (Ed), “Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases”, Libreria Progetto Editore, Pádua, **1985**.
12. K. Fujimoto, T. Miyata, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 3558.
13. M. J. Pelczar Jr., E. C. S. Chan, N. R. Krieg, “Microbiologia - Conceitos e Aplicações”, Makron Books, São Paulo, **1997**, vol. 1, caderno de cores, fig. 4.19.
14. Referência 13, cap. 4.
15. M. Merchat, J. D. Spikes, G. Bertoloni, G. Jori, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1996**, 35, 149.
16. N. S. Soukos, M. R. Hamblin, T. Hasan, *Photochem. Photobiol.*, **1997**, 65, 723.
17. Y. Mikata, Y. Onchi, K. Tabata, S. Ogura, I. Okura, H. Ono, S. Yano, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 4505.

18. M. Perrée-Fauvet, C. Verchère-Béaur, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bône, A. Gaudemer, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13569.
19. K. Driaf, R. Granet, P. Krausz, M. Kaouadji, F. Thomasson, A. J. Chulia, B. Verneuil, M. Spiro, J.-C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.*, **1996**, 74, 1550.
20. M. R. Hamblin, D. A. O'Donnell, N. Murthy, K. Rajagopalan, M. E. Serwood, T. Hasan, "Photoinactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria using Polycationic Photosensitizer Conjugates", 13th International Congress on Photobiology, São Francisco, California, **2000**, 131.
21. M. R. Hamblin, D. A. O'Donnell, N. Murthy, C. H. Contag, A. T. McManus, T. Hasan, "Photodynamic inactivation of Luminescent Bacteria in Contaminated and Infected Wounds in the Mouse", 13th International Congress on Photobiology, São Francisco, California, **2000**, 131.
22. E. D. Sternberg, D. Dolphin, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151.
23. L. R. Milgrom, "The Colours of Life", Oxford University Press, Oxford, **1997**.
24. F. A. Carey, "Organic Chemistry" 2ª Ed., McGraw-Hill, Edição Internacional, **1992**, pag. 810.
25. D. Martin, H. G. Hauthal, "Dimethyl Sulphoxide", tradução por E. S. Halberstadt, Van Nostrand Reinhold Company, Inglaterra, **1975**, pag. 282.
26. P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins", CRC Press, Nova Iorque, **1997**.
27. D. Tanner, P. Somfai, *Tetrahedron*, **1988**, 44, 619.
28. Referência 26, pag. 49 e 50.
29. K. Driaf, R. Granet, P. Krausz, M. Kaouadji, F. Thomasson, A. J. Chulia, B. Verneuil, M. Spiro, J. C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.*, **1996**, 74, 1550.
30. Referência 1, caderno de cores, fig. 17.4.
31. A. J. MacRobert, S. G. Bown, D. Phillips "Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use" John Wiley and Sons, Chichester, **1989**, pag. 9 e 10.
32. G. A. Wistreich, "Microbiology Laboratory – Fundamentals and Applications", Prentice Hall, Nova Jérĩa, **1984**, pag. 54.
33. C. M. Stoscheck, "Quantitation of Protein", *Methods in Enzymology*, **1990**, 182, 60.



## **Capítulo III**

**Síntese de porfirinas acopladas a unidades glicosídicas.**

**Avaliação da actividade antiviral nos vírus herpes  
simplex tipos 1 e 2.**



### 3.1 Introdução

Como vimos nos capítulos anteriores, porfirinas e porfirinas acopladas a compostos adequados, podem ser excelentes fotossensibilizadores para usar na terapia de determinadas enfermidades. Assim, enquanto que no capítulo anterior abordámos o grande problema que são os microrganismos resistentes aos actuais antibióticos, neste propusemos preparar novas porfirinas e estudar a sua acção sobre os vírus herpes simplex tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2).

Os vírus são “seres” que se encontram no limite entre o que pode ser considerado vivo ou não vivo, e só se podem replicar (desenvolver) em células animais, vegetais ou bacterianas.<sup>1</sup>

Até ao momento não existe uma “arma” química contra os vírus, comparável aos antibióticos para os microrganismos (sensíveis). A “arma” mais eficaz contra determinados vírus é a prevenção, e contra outros a vacinação. Esta não actua directamente sobre a partícula infecciosa, mas estimula o sistema imunitário.<sup>2</sup>

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que possuem um sofisticado processo de parasitismo. Isto implica que um agente antiviral para ser eficaz deve ser capaz de penetrar na célula infectada e bloquear o metabolismo do vírus sem afectar o da célula hospedeira. A investigação científica nestas áreas tem investido no desenvolvimento de compostos que bloqueiem a síntese de ADN e RNA viral e não os das células hospedeiras. Poucos são os compostos disponíveis para o tratamento de infecções virais, uma vez que inactivar especificamente vírus e células infectadas com viriões, com considerável segurança para as células normais, continua a ser o maior problema para o desenvolvimento de novos agentes antivirais.<sup>3</sup>

Os vírus HSV-1 e HSV-2, cada um deles com múltiplas estirpes, fazem parte de uma grande família – a *Herpesviridae*, e foram identificados distintamente em 1960. Os vírus herpes são parasitas que fora do organismo vivo morrem ou permanecem adormecidos, mas se entram numa célula, apoderam-se do seu metabolismo para assegurarem a sua replicação. A sua característica principal é controlar o ADN da célula hospedeira e usá-lo para fazer cópias do seu próprio ADN, transformando a célula numa unidade produtora de vírus. Depois de formados no núcleo da célula, os vírus passam para o citoplasma celular



levando consigo um pedaço da membrana nuclear, que dá origem ao invólucro lipídico do vírus.<sup>2</sup>

O HSV-1 é muito contagioso sendo transmitido principalmente por secreções orais. Na maioria das vezes é contraído durante a infância. Se num contacto inicial mais de 90% dos indivíduos apenas desenvolve infecção assintomática, em indivíduos em que o sistema imunitário não está tão desenvolvido os sintomas durante o primeiro episódio podem ser bastante acentuados.<sup>4</sup> Para dar uma ideia da extensão deste problema, 90% dos adultos a partir dos cinquenta anos têm anticorpos do HSV-1, o que significa que são portadores do vírus.<sup>5</sup> No entanto isso não implica que todos venham a sofrer da doença. Cerca de um terço da população mundial sofre de herpes labial, muitas vezes sem o saber. Uma vez contraído, este instala-se no sistema nervoso central para toda a vida. Na maioria dos casos o HSV-1 reside numa forma latente (adormecido) nos gânglios nervosos durante períodos que podem ser mais ou menos longos (meses ou mesmo anos). Estudos mais recentes levam a pensar que os herpes podem estar activos sem causar sinais ou sintomas, designado-se este fenómeno com o termo “herpes não reconhecido”; umas vezes porque as lesões não são visíveis a olho nu, outras porque aparecem em locais pouco visíveis e outras ainda porque são confundidas com sinais de qualquer outra coisa.<sup>4</sup>

Como não é possível erradicar o vírus, este pode ser reactivado - herpes recorrente - dependendo da resistência do sistema imunitário e de uma série de outros factores relacionados com este, como o cansaço, distúrbios hormonais ou emocionais e febre. Mesmo factores ambientais, como variações climáticas, entre muitos outros podem reactivar o vírus. Há quem, no entanto, só tenha um surto enquanto alguns doentes têm uma crise todos os meses, mais no caso das mulheres, que muitas das vezes coincide com o período menstrual.<sup>6</sup>

As infecções por estes vírus manifestam-se com erupções de pequenas bolhas na cavidade oral, em torno dos lábios, queixo, face, em volta do nariz e nos olhos. Duas das infecções mais sérias causadas por este vírus são a inflamação da córnea, que pode causar cegueira,<sup>7,8</sup> e a encefalite, uma inflamação do cérebro que pode ser fatal.<sup>2</sup>

O HSV-2, contrariamente ao HSV-1, é contraído numa idade mais avançada, pelo facto de se tratar de um vírus transmitido por meio de relações sexuais. O vírus está

presente nas lesões e é transmissível mesmo quando não está activo. É interessante referir que metade das pessoas que sofrem de herpes genital, além de serem portadoras do HSV-2, também têm o vírus característico do herpes labial, HSV-1, o que demonstra uma grande diversidade de contactos e contágios. A combinação das duas estirpes aumenta a frequência das ocorrências e a sua gravidade.<sup>6</sup>

O HSV-2 primário desenvolve-se após um período de incubação de dez a vinte dias, com o aparecimento de lesões nos órgãos genitais masculinos ou femininos.

A doença venérea provocada por este vírus é, a seguir à SIDA, a mais comum e conhecida, não só nos Estados Unidos como em muitos outros países.<sup>8</sup> Nos Estados Unidos estima-se que por ano ocorrem noventa e oito milhões de casos de herpes labial e cerca de trinta milhões de casos de herpes genital.<sup>8</sup> Um artigo, recentemente, publicado na imprensa nacional, tinha com título “Vírus do herpes está a aumentar” e alertava para o crescimento significativo da variante genital o que está a suscitar grandes preocupações. Calcula-se que 20% dos adultos estejam infectados, um problema grave principalmente para as mulheres, porque aumenta quatro vezes o risco de cancro do útero.<sup>6</sup> Outros estudos têm apontado para uma ligação entre o HSV-2 e alguns cancros, como o do cérvix do útero ou o da próstata, no entanto essa relação ainda não foi provada.<sup>2</sup>

Sabe-se também, que em casos de indivíduos imunodeprimidos como os doentes oncológicos ou com SIDA, em que o sistema imunitário se encontra muito débil, são altamente susceptíveis a infecções provocadas por herpes. Estas por vezes são tão graves que podem conduzir estes doentes à morte.

O organismo humano não tem capacidade para erradicar o herpes, e até ao momento não existem vacinas ou tratamentos que curem esta patologia definitivamente. Os vírus herpes constituem assim estirpes resistentes aos actuais agentes antivirais como o aciclovir.<sup>8</sup> Os protocolos para estas infecções incluem apenas a eliminação das condições de proliferação da infecção, diminuição da duração da infecção e da manifestação das feridas, bem como o aumento do intervalo entre os episódios de virulência (recidivas). Os doentes infectados com herpes são normalmente tratados com aciclovir. No entanto, os sintomas clínicos permanecem e por isso torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos agentes e protocolos para a eliminação destes vírus e outros da mesma família.

Em 1958, Yamamoto demonstrou que bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), podiam ser inativados com alguns corantes. Nos anos 60, Melnick e Wallis apresentaram outros corantes, como a proflavina e o vermelho neutro, como fotossensibilizadores com forte actividade antiviral *in vitro*, em vírus que infectam animais. No entanto, trabalhos posteriores com objectivos clínicos foram fortemente desencorajadores.<sup>9</sup>

Na década de 80, com o advento da SIDA, a comunidade científica, como já havia acontecido noutras epidemias, despertou novamente para o problema da irradicação dos vírus patogénicos. Intensificaram-se os estudos para encontrar agentes e técnicas que selectivamente eliminassem o vírus HIV e as células por ele infectadas, mantendo os eritrócitos e as proteínas do soro sanguíneo intactas. O interesse crescente nesta área tem dado origem a muitos estudos que resultam, em grande parte, da possibilidade de cura de tecidos infectados por vírus e do receio de transmissão de vírus mortais através do sangue ou seus derivados ou por materiais contaminados.<sup>3,9-15</sup> Disso são também exemplo, uma série de patentes publicadas para a PDT do HIV e de outros vírus patogénicos.<sup>16-19</sup> A transmissão de vírus infecciosos por transfusões tem vindo a decrescer, todavia a absoluta segurança ainda não foi conseguida, e o risco, ainda que diminuto, existe.<sup>15</sup>

Tal como os outros agentes antivirais, os fotossensibilizadores a usar na esterilização de derivados de sangue têm de demonstrar a menor toxicidade possível para as células vermelhas do sangue.<sup>11</sup> Assim a PDT de vírus é um dos desafios futuros para a inactivação de vírus, essencialmente de envelope (invólucro membranar de alguns vírus), uma vez que vários trabalhos têm demonstrado que estes são mais sensíveis à fotoinactivação do que os que não têm envelope.<sup>3,9,11</sup> Em 1987 Perlin e outros mostraram que a hematoporfirina inactivava vírus, como os herpes, citomegalovírus, sarampo, imunodeficiência símia e humana, quer em meios de cultura quer em sangue. Os resultados sobre vírus com envelope abriram um novo campo na PDT mediada por porfirinas como uma nova “arma” contra os vírus.<sup>3,9</sup>

Não é ainda claro em que ponto o vírus é mais sensível, no entanto vários componentes virais como o envelope e algumas enzimas do ciclo replicativo e da síntese de ADN são potenciais alvos. Pensa-se que os lípidos e as glicoproteínas de superfície do envelope viral que actuam como receptores do fotossensibilizador sejam o alvo preferencial da fotoinactivação.<sup>9</sup> Se assim for, o resultando de fotoinactivação de vírus com envelope será idêntico ao postulado para a destruição celular (destruição membranar).

Porfirinas substituídas com hidratos de carbono,<sup>20-26</sup> têm sido descritas como exibindo excelentes propriedades hidrofílicas e uma grande afinidade para as células cancerígenas e partículas virais.<sup>20,22,24</sup> A presença de partes hidrofílicas e hidrofóbicas nestas porfirinas atribui-lhes características anfífilas o que lhes facilita a penetração na membrana das células.

Nos casos em que estas porfirinas glicosídicas são catiónicas, as cargas positivas não só aumentam a sua solubilidade em meios fisiológicos como também contribuem para uma maior afinidade destas para o ADN. A interacção porfirina-ADN é bastante importante na PDT do cancro e de vírus como o HIV-1.<sup>22</sup> Assim, porfirinas ligadas a peptídeos, oligonucleotídeos,<sup>27,28</sup> hidratos de carbono e catiónicas,<sup>29,30</sup> capazes de intercalar e quebrar oxidativamente o ADN, trouxeram uma mais valia para o tratamento do cancro e viroses.<sup>24</sup>

Sabendo que certas porfirinas podem ter uma capacidade antiviral sobre os vírus herpes, como tivemos oportunidade de dizer anteriormente, neste capítulo apresenta-se a síntese de novas porfirinas com unidades glicosídicas, e por último os resultados biológicos obtidos sobre os vírus HSV-1 e HSV-2. Se tais porfirinas apresentarem características químicas e fotofísicas capazes de inactivar os vírus herpes, estamos perante potenciais princípios activos para serem utilizados em novas formulações antivirais.

### **3.2 Síntese de novos fotossensibilizadores porfirínicos acoplados a unidades glicosídicas**

No capítulo anterior descrevemos a síntese de porfirinas ligadas a polilisina e estudámos o efeito fotodinâmico destas sobre bactérias resistentes a antibióticos. Neste capítulo iremos descrever a preparação de porfirinas contendo unidades glicosídicas. Este tipo de compostos apresentam propriedades anfífilas. Preparámos ainda algumas porfirinas catiónicas solúveis em água.

Para realizar os objectivos propostos foi necessário sintetizar alguns macrociclos porfirínicos, *meso*-tetra-substituídos, simétricos e não simétricos com grupos funcionais adequados para serem acoplados às unidades glicosídicas. As porfirinas e os açúcares seleccionados encontram-se apresentados na figura 3.1.

A porfirina simétrica *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina foi preparada por condensação de pirrol com pentafluorobenzaldeído, numa mistura de ácido acético/nitrobenzeno em refluxo; de acordo com métodos descritos na literatura e apresentados no capítulo I. As porfirinas não simétricas foram preparadas de forma análoga, mas em vez de um aldeído usou-se uma mistura de aldeídos, em proporções relativas que favoreceram a formação do macrociclo desejado.<sup>31</sup>

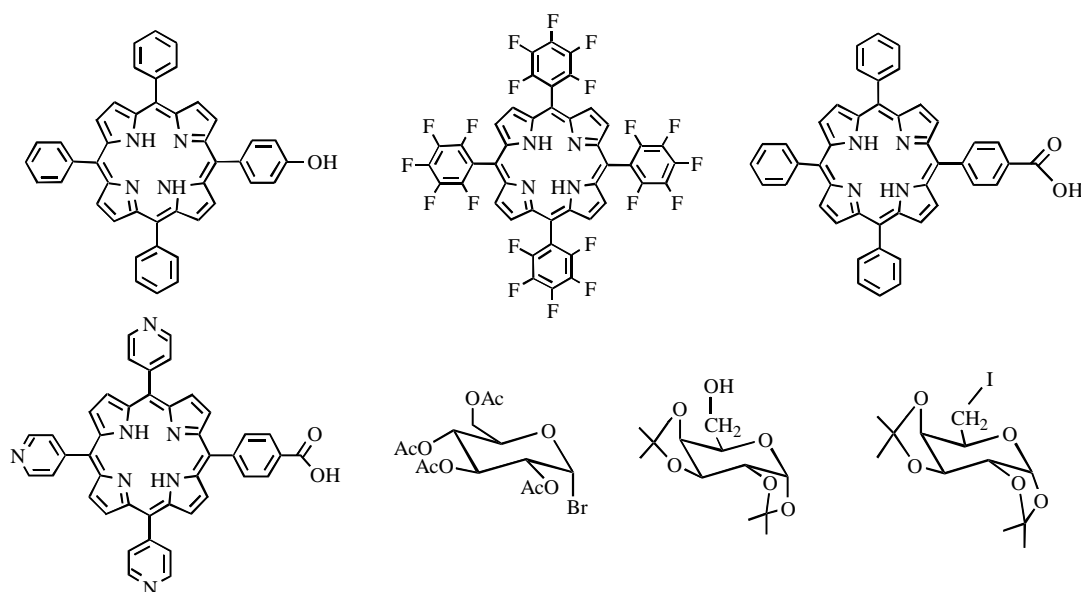


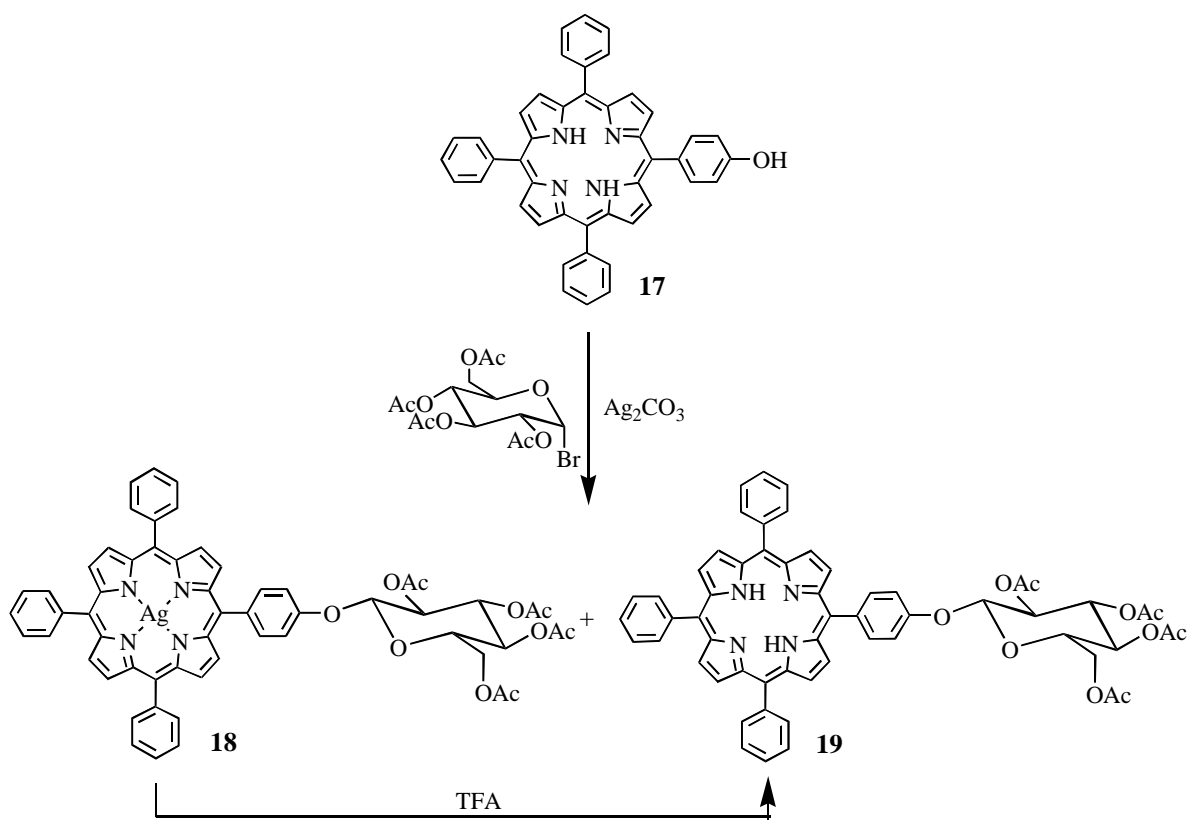
Figura 3.1 Porphirinas base e açúcares utilizados

Preparou-se ainda o macrociclo *meso*-di-substituído 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina (**41**). Testaram-se vários métodos descritos na literatura para o sintetizar, e que já foram apresentados no capítulo I. Acabamos por usar uma modificação de uma dessas metodologias. Após purificação e caracterização dos vários macrociclos, acoplámo-lhes um monossacarídeo, a glucose ou a galactose, construindo assim conjugados de porfirina-açúcar. Para o acoplamento dos açúcares foram usados vários métodos que variam consoante as porfirinas e o açúcar usados.

### 3.2.1 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a glucose

Como já foi referido, uma vez sintetizados os macrociclos porfirínicos base procedeu-se ao acoplamento das unidades glicosídicas. A rota de síntese seleccionada para acoplar a porfirina **17** à 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose encontra-se apresentada no esquema 3.1.

A reacção da 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina **17** com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose ocorreu à temperatura ambiente na presença de carbonato de prata, preparado recentemente, e sulfato de sódio anidro em diclorometano seco.<sup>32</sup> A reacção foi monitorizada por TLC tendo-se verificado ao fim de vinte e quatro horas a conversão quase completa da porfirina de partida em dois novos compostos. Estes foram identificados como sendo o produto desejado **19** (na forma livre) e o correspondente complexo de prata (II) **18** (esquema 3.1).

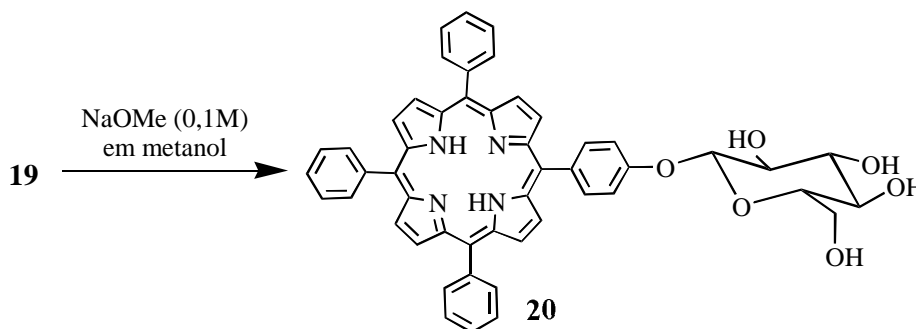


Esquema 3.1

O brometo de prata, entretanto formado, foi filtrado e a mistura reaccional foi cromatografada em coluna de sílica. Como os dois produtos tinham  $R_f$  muito próximos, não foi possível separá-los por coluna. No entanto, tendo-se verificado que a ligação

glicosídica era estável na presença de ácido trifluoroacético (TFA), decidiu-se tratar a mistura com este ácido para remover o metal da espécie **18**. Ao fim de dez minutos, à temperatura ambiente, verificou-se que a porfirina **18** encontrava-se descomplexada. Após cromatografia, o produto **19** foi obtido com um rendimento global de 66%.

A remoção dos grupos acetilo na porfirina **19** foi promovida por metóxido de sódio em metanol, uma vez que a ligação acetal é estável em meio básico. A reacção decorreu numa mistura de diclorometano e metanol, à temperatura ambiente, tendo-se verificado ao fim de seis horas por TLC que a reacção estava praticamente completa. A reacção foi terminada por adição de água e a mistura extraída com diclorometano. A porfirina **20** (esquema 3.2) foi obtida após remoção do solvente e cristalização, com um rendimento de 80%.



Esquema 3.2

Os compostos anteriores foram caracterizados por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , e por espectrometria de massa em FAB positivo.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da porfirina **17** todos os sinais surgem na zona aromática, com excepção do sinal correspondente aos dois prótons NH que surgem a  $\delta$  -2,78 ppm. Devo realçar o surgimento de um duplete ( $J= 8,5$  Hz) a  $\delta$  7,15 ppm correspondente à ressonância dos dois prótons *meta* do fenilo substituído, devido ao efeito dador do grupo hidroxilo. A ressonância dos outros prótons *meta* surge conjuntamente com a dos prótons *para* na forma de um multipeto a  $\delta$  7,72-7,78 ppm. O efeito dador do grupo hidroxilo faz-se sentir ainda sobre os dois prótons *orto* do grupo fenilo substituído, surgindo a ressonância destes sob a forma de um duplete ( $J= 8,5$  Hz) a  $\delta$  8,06 ppm. A ressonância dos outros prótons *orto* aparece na forma de um multipeto a  $\delta$  8,20-8,23 ppm. Por fim, a  $\delta$  8,84-8,88 ppm tem-se um multipeto correspondente aos oito prótons

$\beta$ -pirrólicos. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podemos confirmar a presença do carbono ligado ao grupo hidroxilo a  $\delta$  155,4 ppm, e dos dois carbonos *meta* do grupo fenilo substituído a  $\delta$  113,6 ppm. A estrutura foi ainda confirmada por espectrometria de massa em  $\text{FAB}^+$ , que apresentou um pico a  $m/z$  631  $(\text{M}+\text{H})^+$ . O produto na forma de complexo de prata **18** foi caracterizado apenas por espectrometria de massa com um pico  $m/z$  1068, correspondente ao ião de massa  $(\text{M}+2\text{H})^+$ .

O composto **19** apresenta nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  os sinais correspondentes ao açúcar utilizado na reacção. Relativamente às ressonâncias dos prótons da porfirina de base, não sofreram qualquer modificação significativa no tipo de sinais apresentados antes do acoplamento. Os quatro sinais em forma de singuleto a  $\delta$  2,10, 2,11, 2,12 e 2,22 ppm correspondem aos doze prótons dos quatro grupos acetilo. A  $\delta$  4,06 ppm aparece a ressonância do próton H-5 da glucose sob a forma de um duplo duplete de dupletos ( $J= 9,6, 5,4, 2,4$  Hz), a  $\delta$  4,30 e 4,42 ppm temos dois duplos dupletos ( $J= 12,3$  e  $2,4$  Hz) e ( $J= 12,3$  e  $5,4$  Hz) correspondentes à ressonância de cada um dos prótons H-6 da glucose. Para terminar a  $\delta$  5,30 ppm temos o sinal em forma de triplete ( $J= 9,6$  Hz) correspondente à ressonância do próton H-4 da glucose e a  $\delta$  5,42-5,50 ppm um multiplete correspondente à dos restantes prótons H-1, H-2 e H-3. Quanto ao RMN de  $^{13}\text{C}$  basta realçar os sinais correspondentes aos grupos acetilo do açúcar. A ressonância dos quatro carbonos metílicos do grupo acetilo surgem a  $\delta$  20,6, 20,7 e 20,8 ppm e os outros quatro carbonos carbonílicos surgem a  $\delta$  169,5, 170,3, 170,6 ppm (em ambos os casos, dois são magneticamente equivalentes). O espectro de massa com um pico  $m/z$  961  $(\text{M}+\text{H})^+$ , confirmou a estrutura proposta.

Não foi possível confirmar através das constantes de acoplamento do próton anomérico com o próton H-2 da glucose, se estávamos perante uma ligação  $\beta$  ou  $\alpha$ . No entanto, sabendo que a substituição nucleofílica é  $\text{S}_{\text{N}}2$ , ocorre portanto a inversão da configuração do carbono anomérico do açúcar, o que nos leva a propor a configuração  $\beta$ . Esta situação foi confirmada posteriormente quando realizámos o acoplamento da porfirina di-substituída a glucose (ver 3.4.3.1)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do composto **20**, a porfirina com o açúcar livre, foram realizados em  $\text{DMSO-d}_6$ . O desaparecimento dos sinais dos grupos acetilo, o



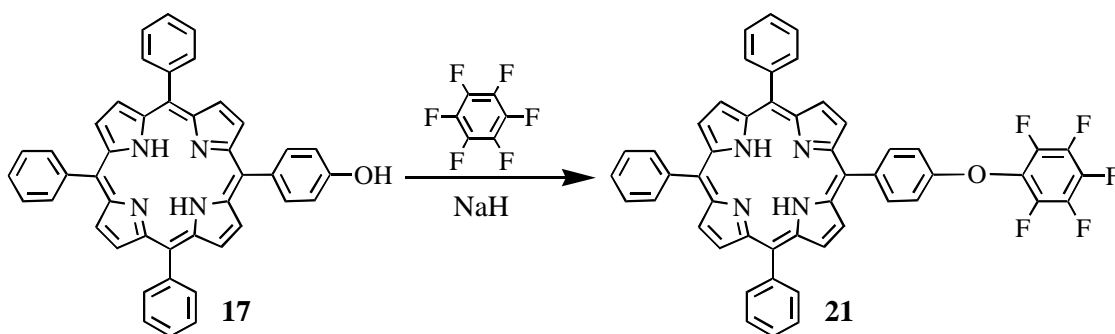
surgimento de um multiplete entre  $\delta$  3,52-3,57 ppm, correspondente à ressonância dos quatro prótons hidroxilo da glucose, e a manutenção ligeiramente alterada dos outros sinais, são a prova clara de que estávamos perante o composto com a estrutura proposta. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresenta os seis sinais correspondentes à ressonância dos seis carbonos da glucose, e o espectro de massa com um pico a  $m/z$  793 correspondente ao ião  $(\text{M}+\text{H})^+$  reforça a estrutura proposta.

### 3.2.2 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose

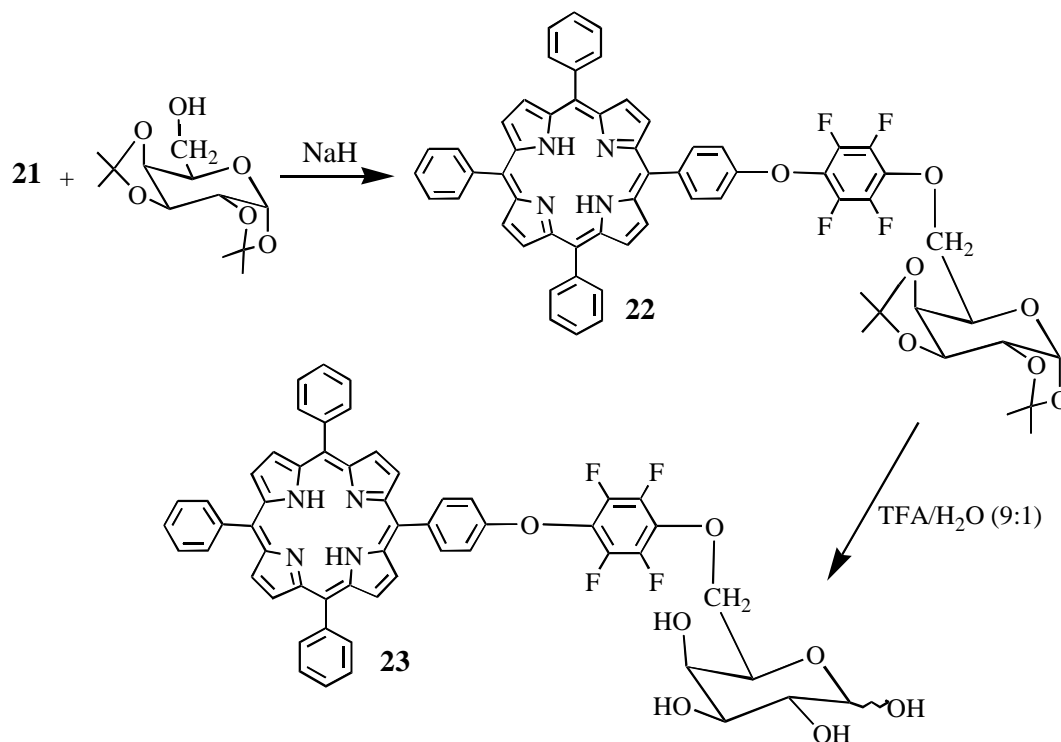
Na sequência do trabalho descrito no ponto anterior, pensámos ligar um “spacer” à porfirina **17** e só depois a unidade glicosídica. Seria interessante comparar posteriormente a actividade biológica dos dois sistemas e ver se a posição do açúcar no macrociclo era fundamental.

Sabendo que compostos com flúor são facilmente substituídos por nucleófilos programámos a sequência reaccional apresentada nos esquemas 3.3 e 3.4 para atingir esse objectivo. Neste caso utilizou-se a galactose.

A reacção de **17** com o hexafluorobenzeno foi realizada na presença de hidreto de sódio, em dimetilformamida (esquema 3.3). Ao fim de quatro hora a 70 °C verificou-se por TLC que a porfirina de partida tinha sido convertida num novo produto (**21**). Este, obtido com um rendimento de 85%, foi em seguida acoplado à 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopirranose (esquema 3.4). A reacção ocorreu nas condições anteriores tendo-se observado por TLC que ao fim de uma hora e trinta minutos a reacção estava completa. O produto **22** foi obtido com um rendimento de 70% após ter sido purificado por cromatografia de coluna de sílica gel e cristalizado.



Esquema 3.3



Esquema 3.4

O composto **23** (forma  $\alpha$  e  $\beta$ ) foi obtido por clivagem dos grupos protectores da porfirina **22** com uma solução de ácido trifluoroacético em água à temperatura ambiente. Passados trinta minutos terminou-se a reacção e neutralizou-se a mistura com uma solução saturada de carbonato de sódio. Após extracção, o produto foi obtido, directamente, por cristalização com um rendimento de 93%.

Os compostos obtidos nesta síntese foram caracterizados por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e de  $^{19}\text{F}$ \*. Os compostos foram ainda submetidos a espectrometria de massa, análise elementar e espectroscopia de visível.

\* A referência usada nos espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  foi o  $\text{C}_6\text{F}_6$  considerando o sinal deste a  $\delta$  -163 ppm, tendo como referência primária o  $\text{CFCl}_3$ , que corresponde a um  $\delta$  de 0 ppm.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **21** destaca-se um pequeno desvio dos sinais dos prótons *meta* e *orto* do grupo fenilo substituído, para frequências um pouco superiores às que apareciam na porfirina de partida. Este facto deve-se ao oxigénio fenólico ser mais electronegativo que o oxigénio hidroxílico, exercendo assim uma menor protecção sobre estes prótons. O espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  prova que o composto tem átomos de flúor com três ambientes diferentes. Um sinal em forma de tripleto ( $J= 21,2$  Hz) a  $\delta -158,10$  ppm que corresponde aos dois átomos de flúor *meta* (relativamente ao oxigénio da porfirina), a  $\delta -155,88$  ppm surge um tripleto ( $J= 21,2$  Hz) correspondente à ressonância do átomo de flúor que está a acoplar com os anteriores, ou seja o flúor da posição *para*. A  $\delta -149,91$  ppm temos um duplete ( $J= 16,9$  Hz) devido à ressonância dos dois átomos de flúor *orto*. O espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta um pico a  $m/z$  797 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ . Por último, a espectroscopia de visível apresentou-nos um espectro do tipo *etio*. Cabe aqui realçar que a introdução das unidades glicosídicas nas porfirinas não alteraram, significativamente, o tipo de espectro de visível dos macrociclos que lhe deram origem.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **22** mantém, sem alterações significativas, o mesmo tipo de sinais dos prótons do macrociclo que o precede, complementado com os sinais que dizem respeito ao açúcar. Assim, a  $\delta$  1,33, 1,35, 1,47 e 1,55 ppm surgem quatro sinais em forma de singuleto correspondentes à ressonância dos quatro metilos dos grupos isopropilideno protectores da galactopirranose. A ressonância dos outros prótons do açúcar aparecem na forma de: um duplo tripleto ( $J= 5,7, 2,0$  Hz) a  $\delta$  4,20 ppm correspondente ao próton H-5, dois duplos dupletos a  $\delta$  4,34 ( $J= 5,2, 2,6$  Hz) e a  $\delta$  4,37 ppm ( $J= 8,0, 2,0$  Hz), um duplete largo ( $J= 5,7$  Hz) a  $\delta$  4,47 ppm e outro duplo duplete ( $J= 8,0, 2,6$  Hz) a  $\delta$  4,66 ppm devidos respectivamente aos prótons H-2, H-4, H-6 e H-3. Finalmente, o próton anomérico aparece na forma de um duplete ( $J= 5,2$  Hz) a  $\delta$  5,54 ppm. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podemos também confirmar a presença do açúcar, já que na zona dos carbonos alifáticos surgem os sinais correspondentes à ressonância dos quatro  $\text{CH}_3$  dos grupos isopropilideno a  $\delta$  24,4, 24,9, 25,9, 25,9 ppm. Os outros sinais dos carbonos da galactose aparecem a  $\delta$  67,0 (C-6), 70,4, 70,7, 71,0 ppm (C-2, 3, 4, 5), e a 96,2 ppm surge o sinal correspondente a ressonância do carbono anomérico. No espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  desaparece o sinal correspondente à ressonância do átomo de flúor na posição *para*, e surgem agora dois dupletos ( $J= 22,6$  Hz) com a mesma integração. Mais uma vez, devido às diferentes contribuições electrónicas do oxigénio do éter bifenílico e do oxigénio do éter

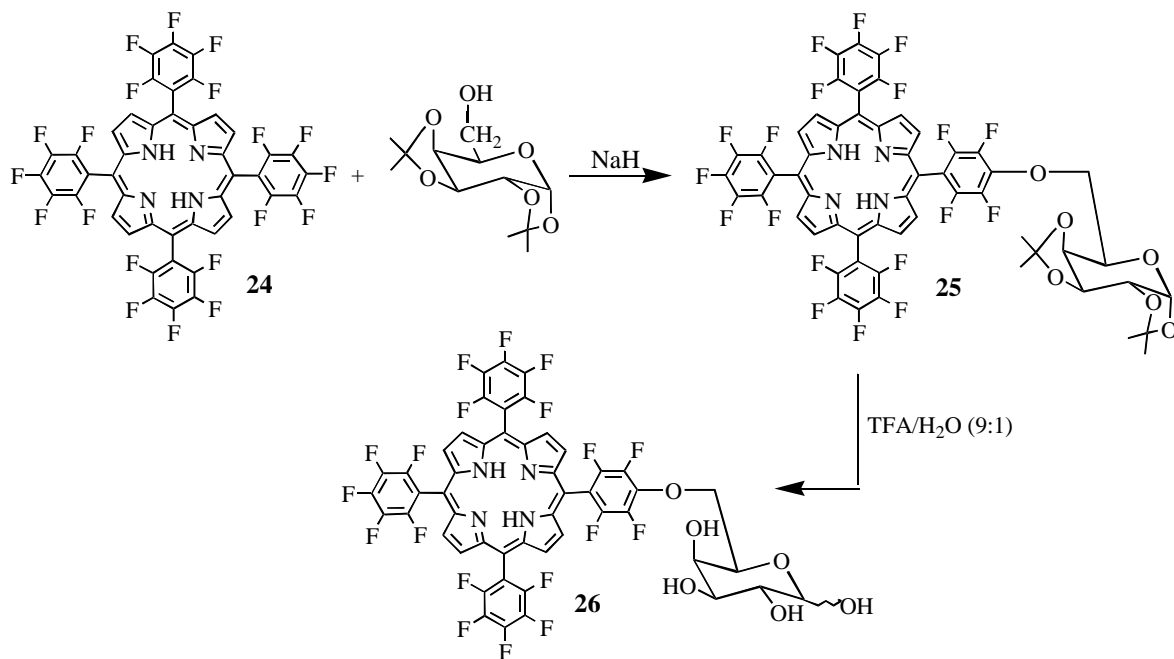
fenílico hidrato de carbono na protecção dos núcleos vizinhos, os átomos de flúor na posição *meta* (relativamente à porfirina) surgem a  $\delta$  -152,40 enquanto os *orto* surgem a  $\delta$  -151,91 ppm. O espectro de massa FAB<sup>+</sup> apresenta um pico  $m/z$  1037 correspondente ao ião (M+H)<sup>+</sup>.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H das porfirinas com a unidade glicosídica desprotegida **23**, mistura de isómeros  $\alpha$  e  $\beta$ , confirma a remoção dos grupos protectores, com o desaparecimento dos sinais dos grupos isopropilidenos e o aparecimento de um conjunto de sinais a  $\delta$  3,63-5,42 ppm relativos aos onze prótons (H e OH) da galactose. Na parte aromática do espectro os sinais correspondentes à porfirina encontram-se menos definidos que nos espectros dos compostos precursores, conseguindo-se no entanto dividir os sinais em dois grupos. A  $\delta$  6,90-8,03 ppm, surge um sinal em forma de multiplete correspondente aos dezanove prótons dos grupos fenilo e o outro a  $\delta$  8,52-8,66 ppm correspondente aos prótons  $\beta$ -pirrólicos. Do espectro de RMN de <sup>19</sup>F cabe realçar que os dois dupletos no composto **23** passaram a dois singuletos largos. A análise do espectro de massa apresentou um pico a  $m/z$  957 (M+H)<sup>+</sup>, confirmando a estrutura proposta.

### 3.2.3 Acoplamento de *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a galactose

Uma vez que a reacção de acoplamento anterior foi conseguida com bom rendimento, e sabendo que compostos com flúor podem ser importantes sob o ponto de vista farmacológico,<sup>33</sup> considerou-se a possibilidade de acoplar a galactose à *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (esquema 3.5).

A reacção da porfirina **24** com 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose ocorreu em tolueno a 110 °C na presença de hidreto de sódio sob atmosfera de azoto. A reacção foi monitorizada por TLC, e ao fim de vinte e quatro horas verificou-se que não evoluía, dando-se assim por terminada. A mistura reaccional foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico e extraída com clorofórmio. O produto foi purificado por cromatografia de coluna e obtido por cristalização com um rendimento de 40%.



Esquema 3.5

O procedimento para a clivagem dos grupos isopropilideno da porfirina **25** foi idêntico ao já utilizado anteriormente na remoção deste tipo de grupos. Após extracção com clorofórmio, o produto **26** foi obtido directamente por cristalização, com um rendimento de 90%.

Os compostos obtidos nesta sequência reaccional foram caracterizados por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>19</sup>F, espectrometria de massa de alta resolução em FAB positivo, análise elementar e por espectroscopia de visível.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da porfirina **25** é bastante simples uma vez que na zona aromática aparece apenas um multipeto a  $\delta$  8,89-9,02 ppm correspondente à ressonância dos oito prótons  $\beta$ -pirrólicos. Para campos mais altos surgem então os sinais correspondentes aos prótons da galactose protegida. A distribuição destes no espectro não difere muito dos já apresentados anteriormente para os compostos com a mesma unidade glicosídica (ver o composto **22**). Quanto ao espectro de RMN de <sup>19</sup>F apresenta mais dois sinais que a porfirina de partida **24**, e a razão dos integrais deixou de ser de 2:1:2, o que sugeriu logo à partida a substituição de um dos átomos de flúor. O sinal correspondente aos átomos de flúor da posição *para*, na região de  $\delta$  -147,90 a -147,73 ppm, deu origem a um integral de onde se pôde constatar o desaparecimento de um desses átomos de flúor. A

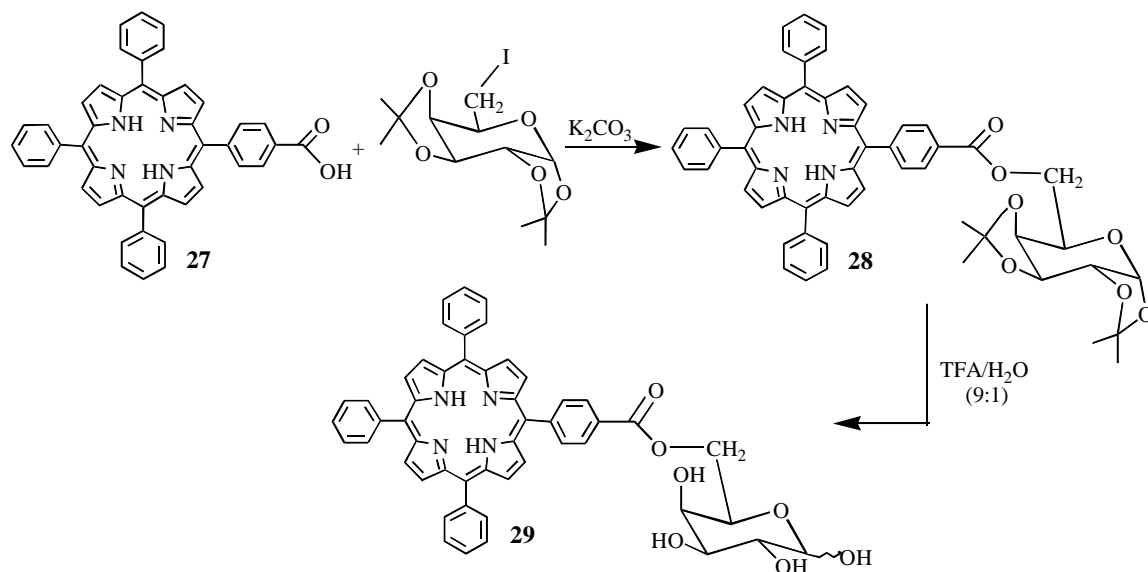
falta de um desses átomos de flúor, e a manutenção dos restantes átomos de flúor, indica inequivocamente que a substituição ocorreu aí. Entre  $\delta$  -157,95 e -157,75 ppm surge um multiplete correspondente aos seis átomos de flúor *meta* dos grupos pentafluorofenilos. A  $\delta$  -152,62 ppm surge um duplo duplete ( $J$ = 22,6, 8,5 Hz) correspondente aos outros dois átomos de flúor *meta* do grupo pentafluorofenilo ligado à galactose. Entre  $\delta$  -135,80 e -135,68 ppm surgem os sinais correspondentes aos dois átomos de flúor *orto* do grupo pentafluorofenilo ligado à galactose, e entre  $\delta$  -133,01 e -132,90 ppm surgem os seis últimos átomos de flúor correspondentes aos outros átomos de flúor da posição *orto*. A massa exacta confirma a composição química do composto, e a espectrometria de visível apresenta-nos um espectro com apenas duas bandas Q, contrariamente às quatro que temos vindo a registar nos outros macrociclos.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da porfirina **26** apresenta na zona de ressonância dos prótons da unidade glicosídica desprotegida, uma situação análoga à descrita para a porfirina **23**. Na zona aromática aparece o multiplete correspondente à ressonância dos oito prótons  $\beta$ -pirrólicos. O espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  é idêntico ao do precursor com a galactose protegida. O espectro de massa apresenta um pico de  $m/z$  igual a 1135 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, o que confirma a estrutura proposta.

#### 3.2.4 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose

Outro dos macrociclos seleccionados para acoplar à galactose foi o derivado **27** com o grupo carboxílico. Todas as tentativas realizadas para esterificar directamente o derivado **27** com o açúcar não foram bem sucedidas. Assim, foi necessário preparar o 6-iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose de acordo com a literatura.<sup>34,35</sup>

Em seguida procedeu-se à reacção de acoplamento de **27** com o açúcar, que decorreu em DMF a 100 °C e na presença de carbonato de potássio (esquema 3.6). Ao fim de trinta horas deu-se a reacção por terminada e o produto foi cromatografado em coluna de sílica gel usando clorofórmio como eluente. O produto foi obtido puro por cristalização com um rendimento de 50%.



Esquema 3.6

A remoção dos grupos protectores do intermediário **28** foi realizada em ácido trifluoroacético aquoso, tal como já foi referido em situações análogas. O produto foi obtido directamente por cristalização com um rendimento de 94%.

Os compostos apresentados no esquema anterior foram caracterizados por espectroscopia de RMN, espectrometria de massa, análise elementar e por espectroscopia de visível.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da porfirina de partida **27** foi feito numa mistura  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , onde se conseguiu uma melhor solubilidade. Todos os sinais aparecem na zona aromática, donde destacamos os sinais correspondentes aos protões do anel substituído que, devido ao grupo carboxílico aparecem a frequências mais altas que os seus congéneres. Assim a  $\delta$  7,73-7,80 e a  $\delta$  8,21-8,24 ppm temos dois multipletos correspondentes respectivamente à ressonância dos nove protões *meta* e *para* e dos seis protões *orto* dos grupos fenilo não substituídos. A  $\delta$  8,32 e 8,46 ppm ( $J = 8,2$  Hz) surgem dois sinais na forma de duplete que correspondem respectivamente à ressonância dos protões *orto*, e *meta* do grupo fenilo substituído. A  $\delta$  8,87 ppm surge então um singuleto largo correspondente à ressonância dos protões  $\beta$ -pirrólicos. Mais uma vez os protões internos (NH) não deram origem a qualquer sinal, devido à sua troca por deutério do metanol deuterado. Por último, o espectro de visível é do tipo *etio*.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **28** foi feito em  $\text{CDCl}_3$ , e apresentou apenas uma única diferença na zona aromática do macrociclo, relativamente ao anterior, o sinal respeitante aos prótons  $\beta$ -pirrólicos que passou de um singuleto largo a um multiplete entre  $\delta$  8,78-8,88 ppm. Os sinais correspondentes à ressonância dos prótons do açúcar também são idênticos aos das porfirinas anteriores (**25** e **22**) que tinham a mesma unidade glicosídica. É de realçar a presença do duplete a  $\delta$  5,7 ppm correspondente ao próton anomérico. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  além dos sinais característicos do açúcar, temos também o sinal do carbono carbonílico a  $\delta$  166,7 ppm. O espectro de massa em  $\text{FAB}^+$  apresenta um pico a  $m/z$  902 ( $\text{M}+2\text{H}$ ) $^+$ , reforçando a estrutura proposta.

A remoção dos grupos isopropilidenos do composto **28** foi confirmada mais uma vez pelo desaparecimento, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **29**, dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons daqueles grupos. O espectro de massa de alta resolução confirmou também a estrutura proposta para o composto.

### 3.2.5 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina a galactose

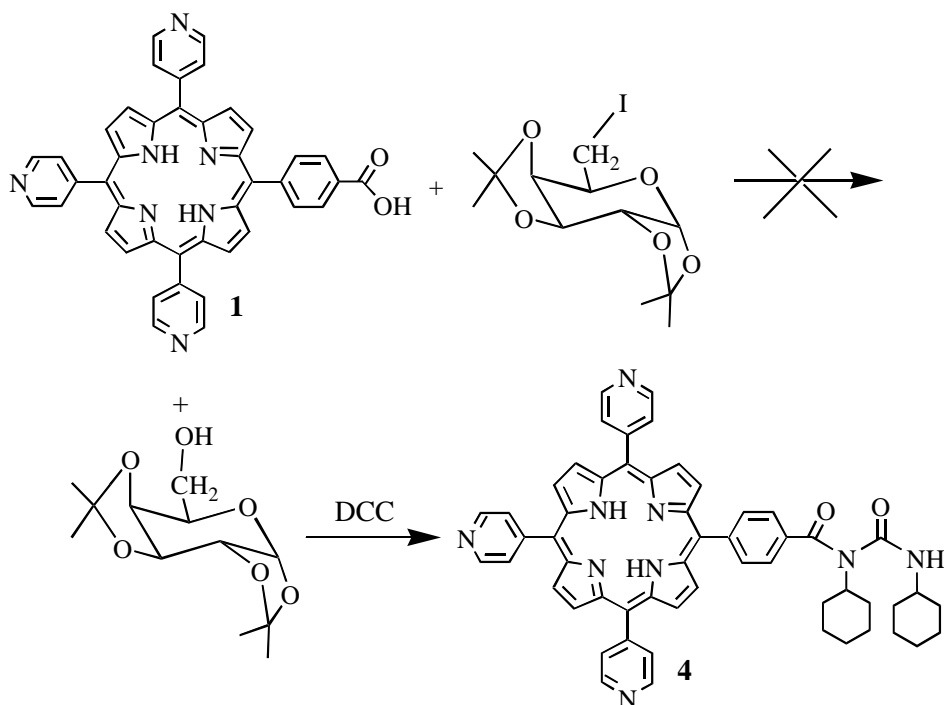
Considerou-se a possibilidade de acoplar o ácido **1**, cuja síntese está descrita no capítulo II, a açúcares. As porfirinas obtidas poderiam ser posteriormente cationizadas, sendo interessante comparar o efeito anti-herpético e também, a toxicidade nas células, das porfirinas glicosídicas neutras e catiónicas.

Quando se pensou realizar a reacção de acoplamento da porfirina **1** com o 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopirranose, aplicou-se um procedimento idêntico ao utilizado na síntese de **28**, isto é, usando o açúcar iodado (6-iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopirranose). Verificou-se no entanto que a reacção não ocorreu, mesmo quando se experimentaram outros solventes orgânicos, ou misturas destes. Uma das razões possíveis para isso, deve-se à desactivação do grupo carbonilo por parte dos grupos piridilo.

Apesar da tentativa de acoplamento do aminoácido lisina a esta porfirina com a DCC, na presença de 4-pirrolidinopiridina, ter dado a ureia **4** e não a amida esperada, como referimos no capítulo II, tentou-se ainda assim, o seu acoplamento ao açúcar na presença

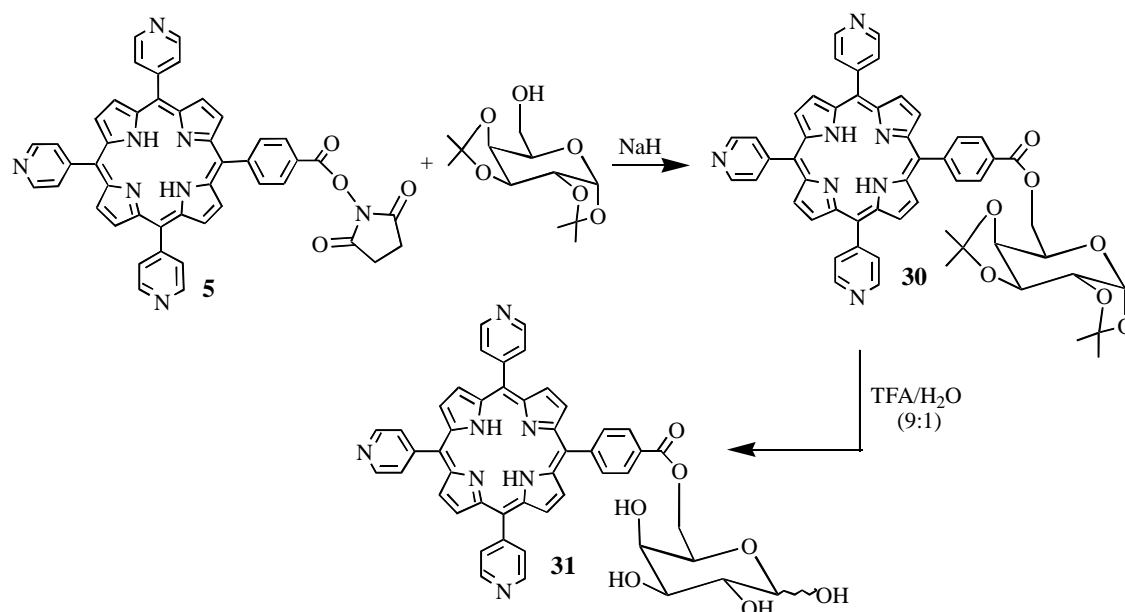


de DCC e do catalisador. Experimentaram-se vários solventes, mas obteve-se também neste caso a porfirina **4** e não o produto desejado (esquema 3.7).



Esquema 3.7

Decidiu-se então, mais uma vez, utilizar o éster activado de *N*-hidroxi-succinimida **5** e fazê-lo reagir com o 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose (esquema 3.8). A reacção de acoplamento decorreu em tolueno seco, na presença de hidreto de sódio em excesso. Ao fim de uma hora e trinta minutos verificou-se por TLC que todo o éster activado tinha reagido, adicionando-se em seguida água à mistura reaccional, que foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico. O produto **30** foi purificado por cromatografia em coluna e obtido com um rendimento de 77% após cristalização.



Esquema 3.8

A porfirina **31** foi preparada a partir de **30**, mais uma vez por desprotecção dos grupos hidroxilo, por procedimento idêntico aos anteriores para a remoção dos grupos isopropilideno. O produto foi obtido directamente por cristalização, com um rendimento de 91%.

A caracterização dos compostos **1**, **4** e **5**, já foi apresentada no capítulo II. Os dois compostos com a galactose acoplada foram caracterizados por espectroscopia de RMN, de visível, por espectrometria de massa e análise elementar.

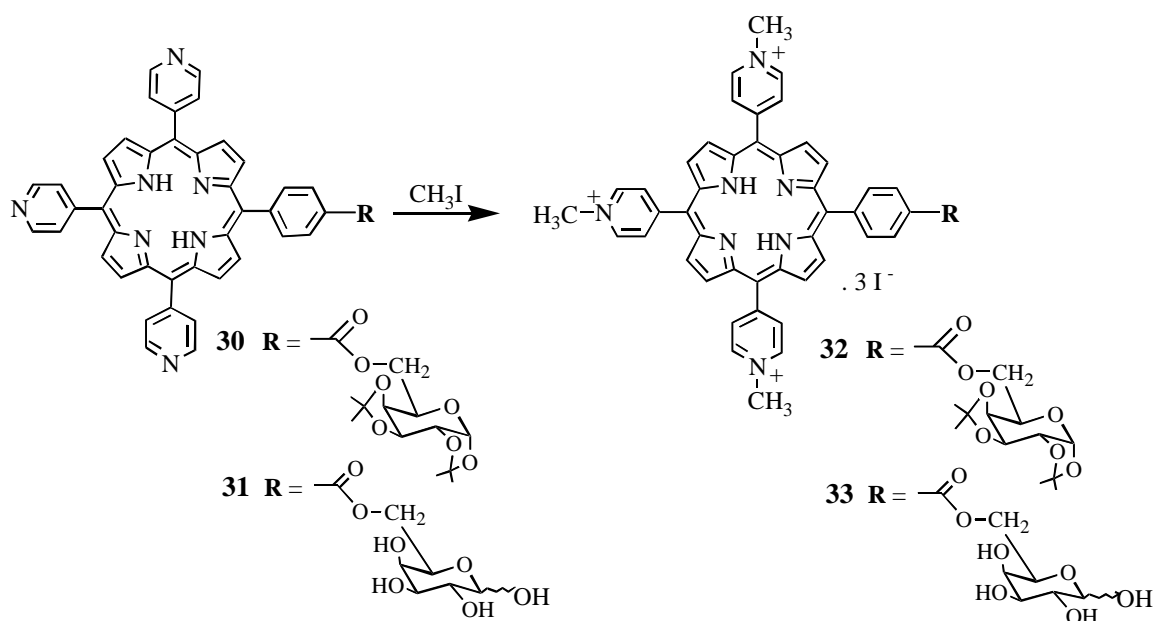
A zona aromática do espectro de RMN de <sup>1</sup>H da porfirina **30** é análogo ao da porfirina precursora **5**, e a zona correspondente às frequências de ressonância dos prótons da galactose protegida, é idêntica às já apresentadas. Quanto ao espectro de RMN de <sup>13</sup>C apresenta os sinais correspondentes aos carbonos da porfirina **1** e do açúcar, com os tipos de sinais referentes a este último também já apresentados na caracterização da porfirina **22**. A estrutura proposta ainda foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **31**, dissolvido em DMSO-d<sub>6</sub> foi o primeiro deste tipo de misturas onde apareceram bem definidos os dois sinais correspondentes aos prótons α e β, dos dois isómeros. A δ 5,02-5,06 e 5,30-5,34 ppm surgem dois multipletos correspondentes à ressonância dos prótons anoméricos (H-α e β) da galactose, a δ 6,37-6,38 e 6,72 ppm surgem sinais em forma de um multipletto e um dupletto (*J*= 6,7 Hz)

correspondente à ressonância dos prótons do grupo hidroxilo da mesma posição (OH- $\alpha$  e  $\beta$ ). Os restantes prótons da galactose surgem na forma de um multiplete entre  $\delta$  3,63 e 4,88 ppm. Na zona aromática do espectro, os quatro prótons do grupo fenilo substituído surgem em forma de um multiplete a  $\delta$  8,31-8,43 ppm, contrariamente ao dois dupletos, bem definidos, que têm vindo a ser apresentados nos compostos com este macrociclo base. O espectro de massa de alta resolução confirmou a estrutura proposta para o composto.

### 3.2.5.1 Metilação dos compostos **30** e **31**

A cationização das porfirinas glicosídicas **30** e **31**, foi realizada em DMF usando um largo excesso de iodeto de metilo (esquema 3.9). O procedimento aplicado foi análogo ao apresentado no capítulo II, aquando da metilação das porfirinas **1** e **5**. Os produtos metilados, depois de filtrados,\* lavados com acetona e secos sob vazio, foram obtidos com rendimentos de 91% (composto **32**) e 90% (composto **33**).



Esquema 3.9

\* Uma vez que o iodeto de metilo é extremamente tóxico, todos os produtos resultantes de metilações foram precipitados, filtrados e a água mãe foi tratada com dietilamina, de forma a que esta destruísse o iodeto de metilo em excesso.

Os compostos **32** e **33** foram caracterizados por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , espectrometria de massa em FAB positivo, por análise elementar e por espectroscopia de visível. O primeiro foi ainda caracterizado por RMN de  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de RMN dos compostos catiónicos foram realizados em DMSO- $\text{d}_6$ .

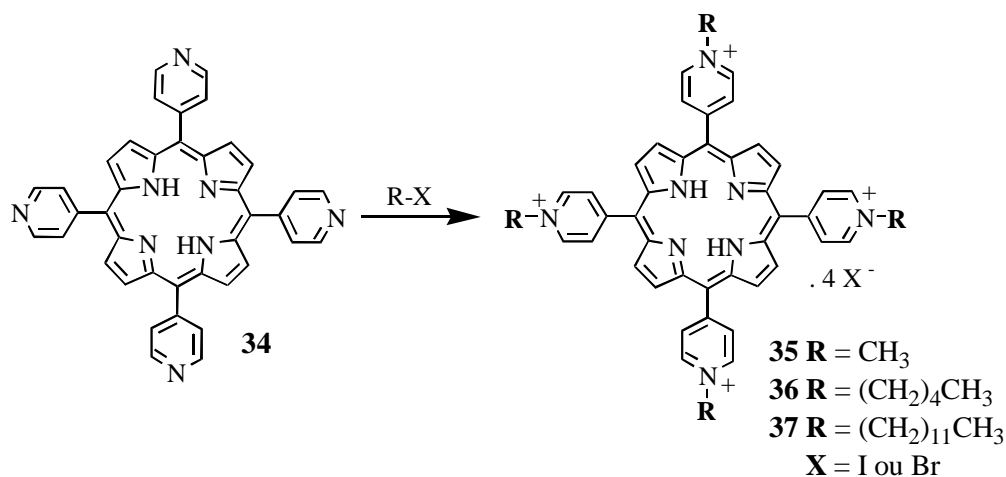
Pela simples análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  destes produtos consegue-se facilmente verificar a metilação total dos grupos piridilo, devido ao singuleto a  $\delta$  4,71 ppm correspondente aos nove prótons dos grupos metilo. Os restantes sinais correspondentes aos prótons das porfirinas de partida mantêm-se quase inalterados, com excepção na zona aromática, onde houve um pequeno deslocamento dos desvios químicos de todos os sinais para campos mais baixos, relativamente aos apresentados nos macrociclos não catiónicos. Este facto deve-se à maior desprotecção que se faz sentir sobre eles, devido ao ambiente químico criado pelas cargas positivas alojadas nos azotos dos grupos piridilo. De salientar ainda que os seis prótons *orto* dos grupos piridilo com os oito prótons  $\beta$ -pirrólicos formam agora um único multiplete. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da porfirina **32** é idêntico ao do composto não catiónico **30**, mas com mais um sinal a  $\delta$  47,96 ppm correspondente à ressonância dos três carbonos dos grupos metilo.

As estruturas **32** e **33** foram ainda confirmadas por massa em FAB $^+$ , apresentando um pico a  $m/z$  948 e 868 ( $\text{M}-3\text{I}$ ) $^+$ , respectivamente.

### 3.3 Cationização da *meso*-tetrapiridilporfirina

Quando realizámos os primeiros ensaios antivirais com as porfirinas com três grupos piridilo neutras e catiónicas, e observámos os seus óptimos resultados antivirais (ver resultados biológicos), pensámos preparar compostos do mesmo tipo mas de síntese mais fácil, como por exemplo, alguns derivados da *meso*-tetrapiridilporfirina.

Assim, considerou-se a possibilidade de cationizar a *meso*-tetrapiridilporfirina com diferentes grupos alquilantes. Para isso usaram-se três haletos de alquila diferentes. A síntese do derivado **35** seguiu o procedimento já descrito na metilação dos derivados porfirínicos com grupos piridilo. Para obter os compostos **36** e **37** seguiram-se procedimentos ligeiramente diferentes (esquema 3.17).



Esquema 3.17

As reacções foram realizadas em DMF seca, usando um largo excesso do haleto de alquilo relativamente à porfirina **34**. As reacções foram controladas por TLC, usando como eluente AcOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (5:2:1), e as porfirinas catiónicas **35** (94%), **36** (75%) e **37** (70%) foram obtidas com bons rendimentos.

As condições de alquilação dependem do haleto de alquilo usado. Enquanto que a porfirina **35** foi obtida após cinco horas de reacção com iodeto de metilo, as porfirinas **36** e **37** só foram obtidas após doze horas de reacção com o 1-iodopentano e o 1-bromododecano, respectivamente a 100 °C e 160 °C. Depois de deixar arrefecer as misturas, os produtos foram precipitados com éter etílico e filtrados. A porfirina **37** foi ainda recristalizada numa mistura clorofórmio/metanol (85:15)/acetona.

Os compostos **35**, **36** e **37** foram caracterizados por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e por espectrometria de massa em FAB positivo. Os dois últimos foram ainda caracterizados por análise elementar e por espectroscopia de visível. Os espectros de RMN dos compostos foram feitos em DMSO-d<sub>6</sub>, como todos os compostos catiónicos já apresentados.

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos três produtos apresentam uma zona aromática idêntica: um duplete ( $J \approx 6,5$  Hz) a cerca de  $\delta$  9,0 ppm, correspondente à ressonância dos oito prótons *orto*; um singuleto aproximadamente a  $\delta$  9,2 ppm correspondente à dos oito prótons  $\beta$ -pirrólicos, e a  $\delta$  9,5 ppm surge um duplete ( $J \approx 6,5$  Hz) correspondente à ressonância dos oito prótons *meta*. Para campos altos ( $\delta \approx -3,1$  ppm) surge um singuleto

correspondente à ressonância dos dois prótons NH. Na zona alifática surgem então os sinais correspondentes à ressonância dos prótons das cadeias carbonadas alquílicas. Para a porfirina **35**, a  $\delta$  4,73 ppm surge o singuleto correspondente à ressonância dos doze prótons dos grupos metilo. Para a porfirina **36** temos a  $\delta$  1,04 ppm um tripleto ( $J= 7,0$  Hz) correspondente à ressonância dos doze prótons dos grupos metilo, a  $\delta$  1,50-1,63 e 2,28-2,33 ppm surgem dois multipletos correspondentes aos dezasseis e os oito prótons ( $\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{CH}_2})_2\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{CH}_2})_2\text{CH}_3$ ), respectivamente e a  $\delta$  4,96 ppm temos um tripleto ( $J= 7,3$  Hz) correspondente aos oito prótons metilénicos ( $\text{CH}_2$ ) ligados aos azotos do grupo piridilo. No espectro da porfirina **37** surge um sinal a  $\delta$  0,86 ppm sob a forma de um tripleto ( $J= 6,9$  Hz) correspondente aos doze prótons metílicos, a  $\delta$  1,27-1,60 ppm surgem as ressonâncias dos setenta e dois prótons (dodecil- $\text{CH}_2$ , dos carbonos 3 a 11) sob a forma de um multiplete, a  $\delta$  2,28 ppm aparece um singuleto correspondente aos oito prótons (dodecil- $\text{CH}_2$ , dos carbonos 2) e a  $\delta$  4,96 ppm temos o tripleto ( $J= 6,9\text{Hz}$ ) correspondente aos oito prótons metilénicos da cadeia carbonada ligados aos azotos dos grupos piridilo da porfirina.

As estruturas dos compostos **35** e **36** foram ainda confirmadas por espectrometria de massa apresentando sinais a  $m/z$  678 e 904 ( $\text{M}-4\text{I}$ )<sup>+</sup>, respectivamente.

### 3.4 Acoplamento de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina a açúcares

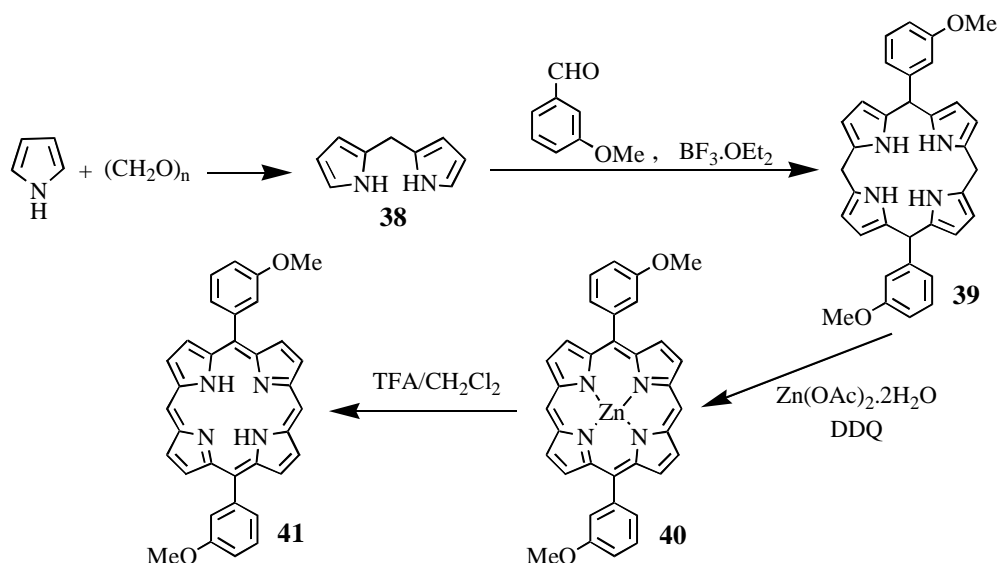
Continuando interessados em obter diferentes compostos para testar em ensaios biológicos resolvemos preparar também macrociclos di-substituídos. Estes macrociclos, substituídos apenas em duas das quatro posições *meso* podem, eventualmente, penetrar mais facilmente nas células, uma vez que são ligeiramente menores que os que temos vindo a descrever. Se assim acontecer, podem chegar a locais mais susceptíveis ao efeito fotodinâmico e desse modo causar, com maior eficiência, a destruição de células alvo.

O primeiro passo para realizar o objectivo proposto, consistiu em sintetizar o macrociclo porfirínico di-substituído **41** (esquema 3.10). A metodologia seguida foi a que vem referenciada na bibliografia [36] apresentada no capítulo I, aquando da apresentação deste tipo de macrociclos, com algumas modificações introduzidas por nós. Em seguida

iremos também apresentar a metodologia seguida na sua derivatização e o acoplamento a unidades glicosídicas.

### 3.4.1 Síntese de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina

Após termos testado vários métodos, acabámos por escolher a metodologia apresentada no esquema 3.10 e que passamos a descrever.



Esquema 3.10

#### a) Síntese do dipirrometano 38

Nesta síntese a formação do dipirrometano não substituído na posição *meso* foi o passo mais difícil, uma vez que estes dipirrometanos são muito instáveis. O dipirrometano foi preparado por condensação de paraformaldeído com pirrol (grande excesso) em ácido acético glacial e metanol. A reacção foi seguida por TLC, revelando o cromatograma com vapores de bromo.

Ao fim de vinte horas, verificou-se que já não se formava mais dipirrometano (mancha cor de rosa na cromatografia em camada fina) e por isso deu-se a reacção por terminada. Em seguida adicionou-se diclorometano à mistura e neutralizou-se a mesma

com uma solução aquosa de KOH. O diclorometano foi evaporado no evaporador rotativo à temperatura ambiente. O pirrol em excesso também foi removido à temperatura ambiente, usando-se para o efeito uma bomba de vácuo com uma “trap” arrefecida em azoto líquido. Recuperou-se cerca de 6 mL de pirrol. No final obteve-se um resíduo preto e oleoso que foi usado na reacção seguinte sem qualquer purificação prévia.

#### **b) Síntese do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinogénio (39)**

O resíduo anterior foi imediatamente retomado em clorofórmio, adicionou-se 3-metoxibenzaldeído e trifluoreto de boro em éter etílico ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ) e deixou-se a agitar à temperatura ambiente. A síntese do porfirinogénio foi seguida por visível, observando-se o aumento da absorvência ao comprimento de onda correspondente ao porfirinogénio ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ). Ao fim de dezasseis horas verificou-se que todo o dipirrometano tinha reagido (desaparecimento da cor rosa no cromatograma em camada fina) e por isso terminou-se a reacção.

#### **c) Oxidação do porfirinogénio 39**

Sintetizado o porfirinogénio, procedeu-se à sua oxidação com DDQ na presença de acetato de zinco, tendo-se seguido o evoluir da reacção por visível e por TLC. A reacção decorreu durante oito horas em clorofórmio em refluxo ( $60^\circ \text{C}$ ), tendo-se adicionado o oxidante em pequenas porções, evitando dessa forma uma possível degradação da porfirina. Uma vez terminada a reacção lavou-se a mistura reaccional com uma solução saturada de carbonato de sódio; após extracção com clorofórmio a mistura de porfirinas foi separada por cromatografia de coluna de sílica. Obtiveram-se quatro fracções: a primeira, de maior  $R_f$ , foi identificada como sendo o 5-(3-metoxifenil)porfirinatozinco(II), a segunda o 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatozinco(II), a terceira a 5-(3-metoxifenil)porfirina e a quarta a 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina.



**d) Descomplexação do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatozínco(II) (40)**

O complexo **40** foi tratado com uma solução de ácido trifluoroacético a 10% em diclorometano. A descomplexação decorreu durante 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi então neutralizada com uma solução saturada de carbonato de sódio, e por fim lavou-se com água. O macrociclo pretendido **41** foi então cristalizado.

No final destes passos, obteve-se a porfirina livre com um rendimento total de 13%.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da porfirina **41** é bastante diferente dos que temos vindo a analisar até aqui. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  surge um sinal na forma de singuleto a  $\delta$  -3,12 ppm correspondente à ressonância dos prótons NH do macrociclo; observa-se um outro singuleto a  $\delta$  4,02 ppm correspondente à ressonância dos prótons dos dois grupos metoxilo. Na parte aromática observa-se um duplo duplete ( $J= 7,9, 2,4$  Hz) a  $\delta$  7,36 ppm correspondente à ressonância dos dois prótons *para*, um triplete ( $J= 7,9$  Hz) a  $\delta$  7,69 ppm correspondente à dos *meta*, e um multiplete a  $\delta$  7,84-7,88 ppm correspondente à dos prótons *orto*. A  $\delta$  9,12 e 9,38 ppm surgem dois dupletos ( $J= 4,6$  Hz) correspondentes à ressonância dos prótons  $\beta$ -pirrólicos e por fim a  $\delta$  10,30 ppm surge a ressonância dos dois prótons *meso* sob a forma de um singuleto. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  observa-se o sinal dos grupos metoxilo a  $\delta$  55,6 ppm. O espectro de massa apresenta um pico a 523 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, confirmando a estrutura apresentada. Por último, a espectroscopia de visível apresentou-nos o espectro característico de porfirinas livres, onde temos a banda Soret e as quatro bandas Q. Neste composto a banda QIII<QII, estamos assim na presença de um espectro do tipo *phyllo*.

**3.4.2 Funcionalização da 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina**

Uma vez que o objectivo final era ligar a porfirina di-substituída **41** a açúcares, foi necessário introduzir-lhe um grupo funcional adequado. Pensou-se que a função ácido seria uma boa escolha pois permitir-nos-ia, com base na experiência anterior, acoplar quer a glucose quer a galactose. Para além disso pretendíamos criar nas moléculas finais pólos

bem definidos (afastados), ou seja, formar nas moléculas uma zona mais polar, afastada da menos polar. Para isso, optou-se por introduzir na posição *meso* do macrociclo porfirínico o grupo ácido propenóico ( $-\text{CH}=\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ ).

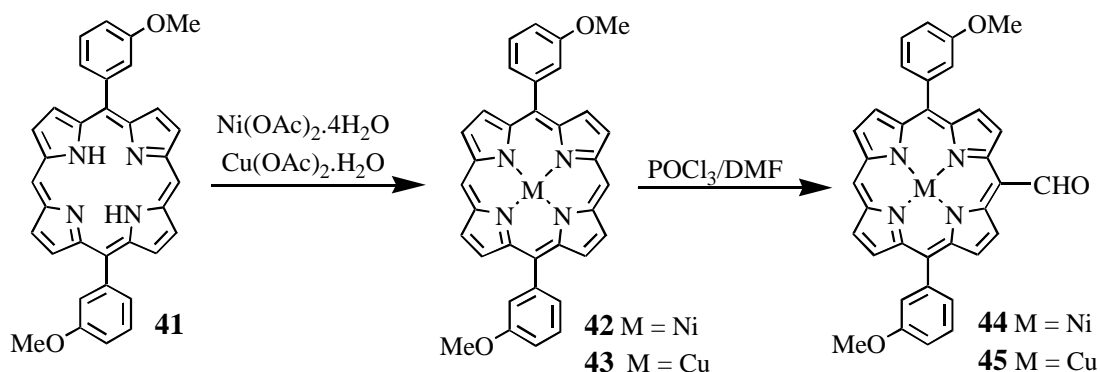
A metodologia de síntese seleccionada para a introdução daquele grupo encontra-se apresentada nos esquemas 3.11 a 3.13, e envolve a formilação do macrociclo em condições de Vilsmeier, seguida de uma reacção de Wittig.

#### 3.4.2.1 Formilação em condições de Vilsmeier

Para formilar o macrociclo em condições de Vilsmeier ( $\text{POCl}_3/\text{DMF}$ ), é necessário complexá-lo com níquel(II) ou com cobre(II). Desta forma evita-se a protonação dos azotos pirrólicos (tornando o macrociclo não reactivo) e simultaneamente activa-se a periferia do anel, tornando-o mais nucleofílico. De início, a escolha do níquel, em detrimento do cobre, permitiu caracterizar por espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$  os produtos que se iam obtendo e assim acompanhar melhor as reacções. No entanto, mais tarde formilámos também o complexo de cobre da porfirina **41** para ver se a metaloporfirina **45** era mais fácil de descomplexar do que a porfirina formilada complexada com níquel **44**.

Os produtos **42** e **43** foram então obtidos por aquecimento da porfirina **41** a 60 °C, respectivamente, com acetato de níquel e de cobre, numa mistura clorofórmio e metanol (esquema 3.11). Os dois complexos **42** e **43** foram obtidos directamente por cristalização, com muito bons rendimentos, 94% e 95%, respectivamente.

A metaloporfirina **42** apresentou um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  idêntico ao da porfirina inicial, apenas sem o sinal a desvios químicos negativos. O espectro de massa confirmou também a formação do complexo. O espectro de visível é característico dos macrociclos complexados.



Esquema 3.11

A introdução do grupo formilo na posição *meso* livre, foi conseguida por tratamento dos complexo **42** ou **43** com  $\text{POCl}_3$  e DMF em clorofórmio seco a 40 °C. A evolução da reacção foi seguido por TLC, dando-se a formilação por terminada ao fim de oito horas. Se prolongássemos o tempo de reacção correríamos o risco de formilar outras posições. A mistura reaccional foi tratada com uma solução saturada de carbonato de sódio, durante toda a noite à temperatura ambiente, procedendo-se desta forma à hidrólise do produto intermediário da reacção de Vilsmeier. Finda a hidrólise, as metaloporfirinas monoformiladas foram cromatografadas por coluna de sílica gel, usando tolueno como eluente. As metaloporfirinas **44** e **45** foram obtidas por cristalização com rendimentos de 79% e 86%, respectivamente.

O composto **44** foi caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massa em FAB positivo.

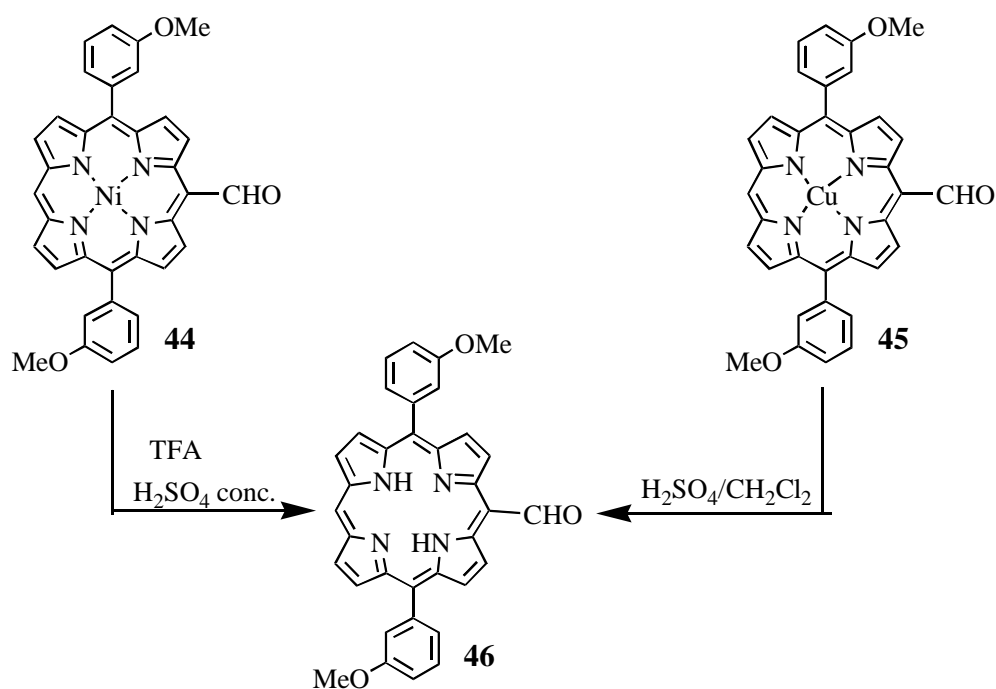
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , já não é tão “simples” como os dois analisados anteriormente, uma vez que com a introdução do grupo formilo o macrociclo deixou de ser simétrico. O RMN de  $^1\text{H}$  evidencia o sinal do protão do grupo formilo a  $\delta$  11,99 ppm sob a forma de singuleto. Os oito protões  $\beta$ -pirrólicos aparecem distribuídos por dois dupletos a  $\delta$  8,69 e 8,91 ppm ( $J = 4,8$  Hz), e dois dupletos a  $\delta$  8,86 e 9,75 ppm ( $J = 5,2$  Hz). A  $\delta$  3,94 ppm surge o singuleto correspondente à ressonância dos protões dos grupos metoxilo. A  $\delta$  7,24-7,28 ppm surge um multipletto correspondente à ressonância dos protões *para*, e a  $\delta$  7,48-7,60 ppm temos um multipletto correspondente à ressonância dos seis protões *orto* e *meta*. Resta um singuleto a  $\delta$  9,54 ppm correspondente apenas a um

protão *meso*. Isso e a manutenção de todos os outros prótons do núcleo porfirínico de partida, indica-nos inequivocamente a posição do grupo formilo. Do RMN de  $^{13}\text{C}$  cabe assinalar a  $\delta$  193,0 ppm o carbono carbonílico. Quanto ao espectro de massa com um pico a  $m/z$  607 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^{+}$  confirmou a estrutura proposta.

### 3.4.2.2 Descomplexação das metaloporfirinas formiladas

Este foi o ponto mais difícil de ultrapassar. Quisemos retirar o níquel nesta fase para não avançarmos mais com o complexo, uma vez que pretendíamos os produtos finais e mesmo alguns intermediários na forma livre. Ao tentar descomplexar a metaloporfirina **44** com ácido sulfúrico, esta deu origem a vários produtos de degradação, dando na melhor das tentativas 66% de porfirina descomplexada **46** (esquema 3.12); embora em condições não reprodutíveis.

Foi aqui que decidimos preparar o complexo de cobre, já citado atrás, e formilá-lo para tentar a remoção do metal em condições ácidas mais suaves. Esta alternativa não trouxe nenhuma melhoria para a obtenção de **46** (43%).



Esquema 3.12

Já durante a elaboração desta tese, o grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro tomou conhecimento de como preparar *meso*-tetrafenilporfirinas formiladas na forma livre, com melhores rendimentos. Apesar desse procedimento ainda não ter sido testado nas porfirinas di-substituídas, esperamos poder resolver o problema da descomplexação destas.

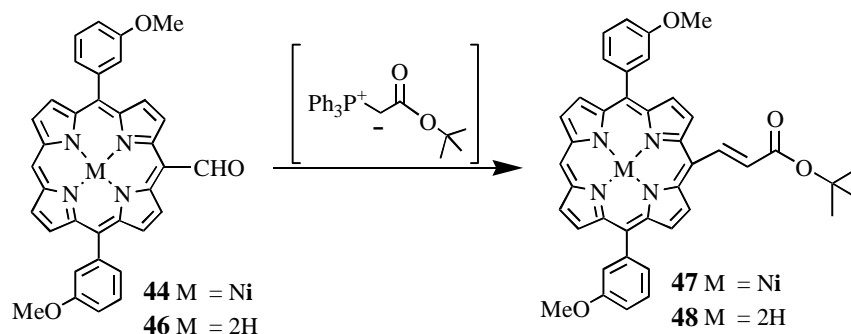
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da porfirina **46** é idêntico ao da metaloporfirina **44**, com apenas duas diferenças a assinalar. A primeira é óbvia, o surgimento de um singuleto a desvios químicos negativos,  $\delta$  -2,51 ppm, correspondente à ressonância dos prótons NH. A outra diferença é a passagem do singuleto correspondente ao próton *meso* para desvios químicos superiores aos  $\beta$ -pirrólicos. O RMN de  $^{13}\text{C}$  continua a apresentar a ressonância do carbono carbonílico ( $\delta$  195,3 ppm) e mais uma vez o ião molecular do composto 551  $(\text{M}+\text{H})^+$  veio confirmar a estrutura proposta.

#### 3.4.2.3 Reacção de Wittig e remoção do grupo *t*-butilo

Uma das formas mais eficazes para a introdução de substituintes insaturados é através da reacção de Wittig. Neste tipo de reacções há o ataque de um ileto a um carbono carbonílico e, por eliminação de óxido de trifenilfosfina, forma-se o alceno correspondente ao ileto usado.

##### a) Reacção de Wittig

Uma vez que já havíamos inserido o grupo formilo no macrociclo **44** e **46**, a reacção de Wittig de cada uma delas com o *t*-butoxicarbonilmetileno-trifenilfosforano promoveu a introdução do grupo acrilato na posição *meso* do macrociclo, obtendo-se dessa forma o alceno correspondente (esquema 3.13).



Esquema 3.13

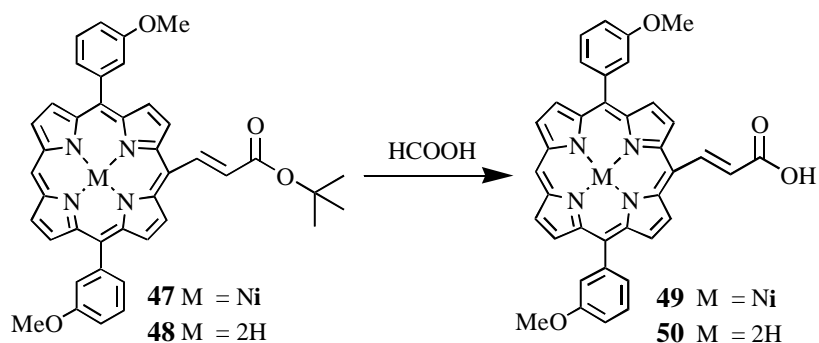
A reacção da metaloporfirina **44** com o *t*-butoxicarbonilmetileno-trifenilfosforano, em diclorometano, decorreu durante seis horas e trinta minutos em refluxo (40 °C), tendo sido completa. No caso da porfirina formilada livre **46**, aplicou-se o mesmo procedimento, mas neste caso a reacção só foi dada por concluída ao fim de vinte e quatro horas. As porfirinas **47** e **48** foram purificadas por cromatografia rápida de coluna de sílica usando diclorometano como eluente. Ambos os compostos foram obtidos por cristalização com um rendimento de 97%.

Fazendo a análise de RMN de  $^1\text{H}$  de uma das porfirinas, por exemplo da **48**, temos a acrescentar ao espectro da porfirina de partida **46**, um sinal na forma de um singuleto a  $\delta$  1,66 ppm correspondente à ressonância dos três grupos metilo, e dois sinais na forma de dupletos ( $J = 15,6$  Hz) a  $\delta$  6,27 e 9,86 ppm, correspondentes à ressonância dos dois prótons vinílicos. O sinal a  $\delta$  9,86 ppm corresponde ao próton mais desprotegido, ou seja, o que está mais afastado do grupo carbonilo ( $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ). Da análise do mesmo espectro podemos ainda verificar o desaparecimento do próton do grupo formilo, característico do reagente de partida.

As estruturas dos compostos **47** e **48** foram ainda confirmadas por espectrometria de massa apresentando sinais a  $m/z$  704 ( $\text{M}^+$ ) e a 649 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), respectivamente.

b) Remoção do grupo *t*-butilo

Um dos objectivos deste trabalho era ligar açúcares às porfirinas anteriores. Para isso procedeu-se à remoção do grupo *t*-butilo, obtendo-se assim os correspondentes ácidos carboxílicos (esquema 3.14).



Esquema 3.14

As porfirinas **47** e **48** foram tratadas com ácido fórmico, embora na primeira fosse necessário adicionar clorofórmio para uma melhor dissolução da porfirina. As reacções foram controladas por TLC, e ao fim de sete horas à temperatura ambiente a transformação tinha sido completa. Os ácidos correspondentes, depois das misturas reaccionais terem sido devidamente neutralizadas e lavadas, foram directamente obtidos por cristalização com um rendimento de 96%.

Da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos dois ácidos temos apenas a salientar o desaparecimento do singuleto correspondente aos nove protões do grupo *t*-butilo, quanto aos restantes sinais dos espectros mantêm-se muito idênticos aos dos correspondentes ésteres de partida.

Os espectros de massa de **49** e **50** apresentaram respectivamente um pico a *m/z* 648 (M<sup>+</sup>) e a *m/z* 593 (M+H)<sup>+</sup>, sendo assim mais um elemento a confirmar as estruturas propostas.

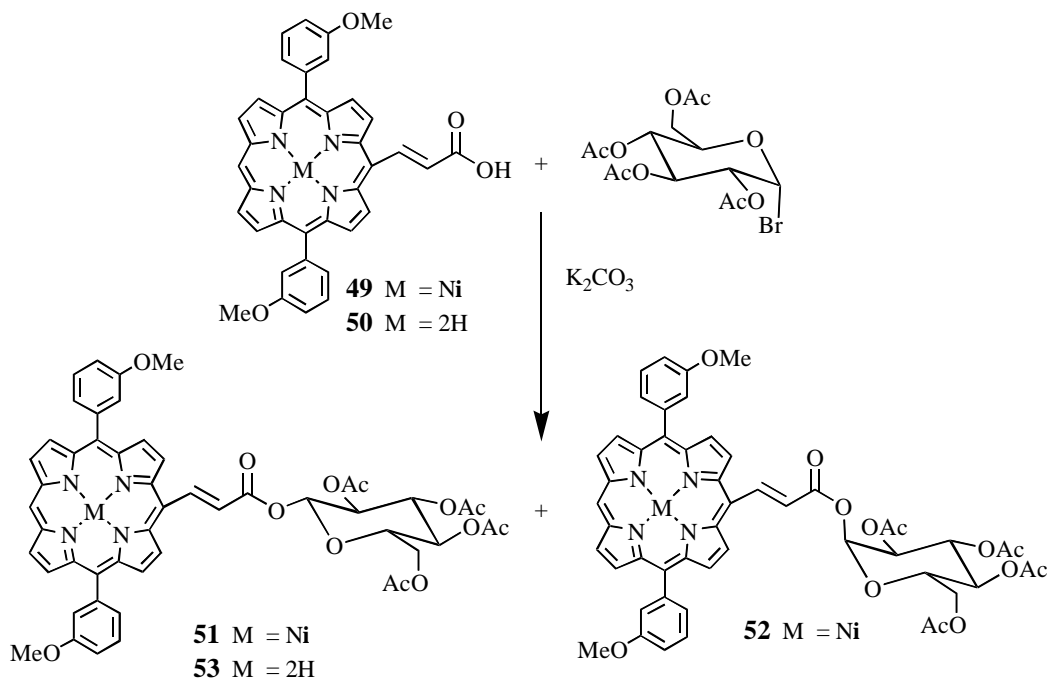
### 3.4.3 Acoplamento às unidades glicosídicas

Seguindo a linha inicialmente proposta, iremos em seguida apresentar os estudos realizados para acoplar as porfirinas com grupo ácido **49** e **50** aos açúcares glucose e galactose.

#### 3.4.3.1 Reacção com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopirranose

Os ésteres glicosídicos **51** e **52** foram preparados por esterificação do ácido carboxílico **49** com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopirranose em DMF, em presença de carbonato de potássio (esquema 3.15). A reacção foi controlada por TLC e ao fim de quatro horas, à temperatura ambiente verificou-se que a porfirina de partida havia sido totalmente consumida. Quando se usou um grande excesso de açúcar, formaram-se dois produtos, um maioritário (menor  $R_f$ ) e outro minoritário (maior  $R_f$ ), com um rendimento de 81% e 9%, respectivamente. Os dois isómeros foram separados por TLC preparativa, usando clorofórmio como eluente. Era de esperar que o isómero mais abundante fosse o  $\beta$ , como já anteriormente tínhamos referido quando se estudou o acoplamento deste açúcar à 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (**17**). No entanto desta vez confirmou-se por RMN de  $^1\text{H}$  que o isómero mais abundante foi o  $\beta$  (ver estudo dos dois espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos isómeros  $\alpha$  e  $\beta$ , fig. 3.1). Usando um pequeno excesso de 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopirranose só se identificou o isómero  $\beta$  confirmando mais uma vez que esta substituição nucleofílica é preferencialmente  $\text{S}_{\text{N}}2$ , ocorrendo a inversão de configuração do carbono anomérico do açúcar de partida.





Esquema 3.15

O éster **53** foi preparado da mesma forma que os anteriores, mas agora por esterificação do ácido **50** com o mesmo açúcar (esquema 3.15). Neste caso só se formou o isómero  $\beta$ , tendo este sido obtido directamente por cristalização em clorofórmio/metanol com um rendimento de 94%.

Os compostos **51** e **53** apresentam espectros de RMN de  $^1H$  muito semelhantes, salvo a devida excepção de que o **51** não apresenta nenhum sinal para campos altos, por se encontrar complexado. Uma vez que a seguir vou apresentar os espectros dos dois isómeros **51** e **52** para provar qual dos dois é o  $\alpha$  ou o  $\beta$ , vou analisar aqui o espectro da porfirina **53**.

O espectro da porfirina **53** apresenta-se como sendo a soma dos sinais correspondentes aos prótons da unidade porfirínica **50** com os da unidade glicosídica. A  $\delta$  2,05, 2,07, 2,08, 2,14 ppm temos quatro singuletos correspondentes aos grupos acetilo, a  $\delta$  4,08 ppm surge um duplo duplete de dupletos ( $J= 9,4, 4,2, 2,1$  Hz) correspondente à ressonância do próton H-5 da glucose. A  $\delta$  4,28 e a 4,45 ppm aparecem dois duplos dupletos ( $J= 12,5, 2,1$  Hz) e ( $J= 12,5, 4,2$  Hz), correspondentes às ressonâncias dos prótons H-6 da glucose. Para frequências superiores aparecem as ressonâncias dos restantes prótons do açúcar:

- O próton H-4 a  $\delta$  5,30 ppm na forma de um tripleto ( $J= 9,4$  Hz);
- Os prótons H-2 e H-3 na forma de um multipeto a  $\delta$  5,42-5,53 ppm;
- O próton anomérico a  $\delta$  6,10 ppm na forma de um dupeto ( $J= 7,8$  Hz).

Os compostos **51**, **52** e **53** foram ainda caracterizados por espectrometria de massa obtendo-se os sinais a  $m/z$  978 ( $M^+$ ), para os dois primeiros e a  $m/z$  923 ( $M+H$ )<sup>+</sup> para o último.

### Estudo comparativo dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ dos isômeros $\alpha$ e $\beta$

Para caracterizar cada um dos isômeros, ou seja determinar a configuração de cada um deles, fizemos a análise dos desvios químicos e das constantes de acoplamento vicinais dos prótons anoméricos. Estes parâmetros dependem da orientação equatorial ou axial dos prótons referidos (fig. 3.1).

Em relação aos desvios químicos, os prótons anoméricos equatoriais aparecem para frequências mais altas do que prótons quimicamente semelhantes em posições axiais, devido ao efeito da anisotropia magnética das ligações C-C e C-O. No nosso caso para o isômero  $\beta$  a ressonância de H-1 surge a  $\delta$  5,98 ppm e a do isômero  $\alpha$  a  $\delta$  6,63 ppm.

Relativamente às constantes de acoplamento do próton anomérico, sabendo que  $J_{aa}$  é muito superior a  $J_{ea}$  ou  $J_{ee}$ , permite-nos confirmar as estruturas propostas anteriormente. Para o isômero  $\beta$  temos uma  $J_{aa}= 7,9$  Hz e para o isômero  $\alpha$  uma  $J_{ea} = 3,7$  Hz.

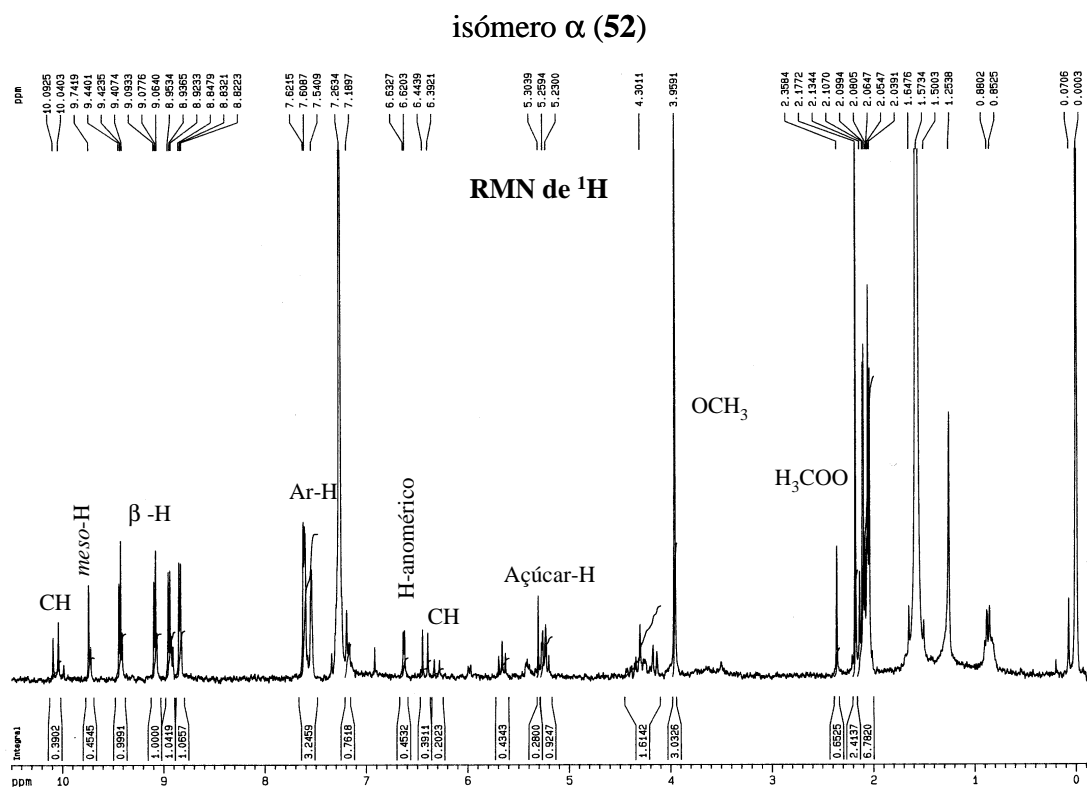
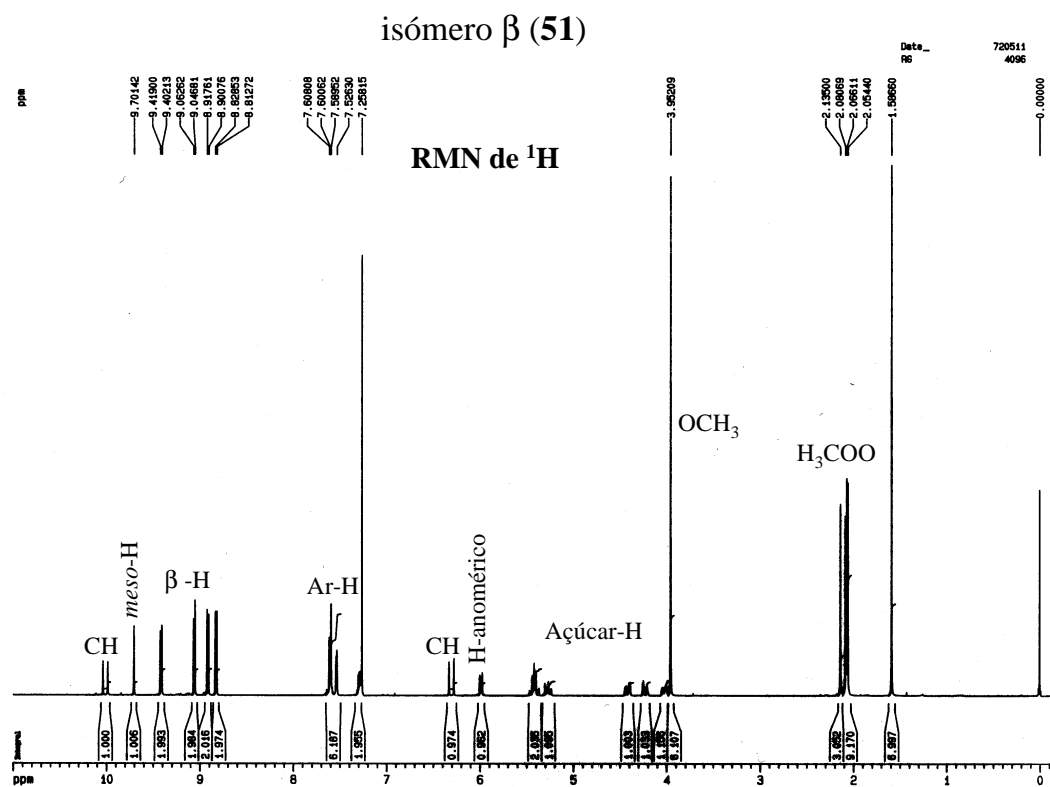
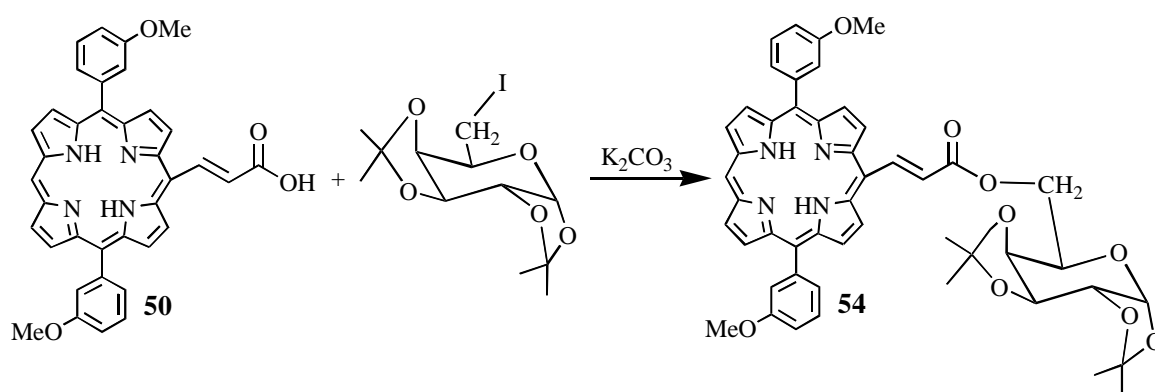


Figura 3.1 Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos isômeros  $\beta$  (51) e  $\alpha$  (52)

### 3.4.3.2 Síntese de 5-[2-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina

O éster **54** foi preparado de modo idêntico aos anteriores, no entanto a esterificação do ácido **50** com o 6-iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose (esquema 3.16), não decorreu à temperatura ambiente como nos casos anteriores, mas sim a 80 °C. A reacção, foi seguida por TLC e ao fim de vinte e quatro horas verificou-se o consumo total da porfirina de partida. Apesar de se ter obtido um único produto, este teve de ser separado, por cromatografia em coluna, do açúcar de partida usado em excesso. Neste caso só se formou o isómero  $\alpha$ , tendo sido cristalizado com um rendimento de 90%.

O RMN de  $^1\text{H}$  deste produto apresenta os sinais correspondentes às ressonâncias dos prótons do ácido de partida mais os sinais dos prótons da unidade glicosídica. Tanto os primeiros como os segundos já foram discutidos anteriormente, reportando assim a caracterização de cada uma das zonas do espectro para a caracterização das porfirinas **50** e **22**, respectivamente. O espectro de massa apresentou um pico a  $m/z$  835, confirmando a estrutura proposta.



Esquema 3.16

## 3.5 Ensaio biológicos em vírus

As análises com vírus animais envolvem algum equipamento específico e uma execução laboratorial dispendiosa. No entanto, graças a uma estreita colaboração com o grupo da Professora Luísa Valdeira da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa,

foi-nos possível realizar alguns ensaios para avaliar as potencialidades antivirais de alguns dos produtos obtidos, bem como dos seus precursores. Os compostos depois de caracterizados, foram sujeitos a ensaios de toxicidade e de avaliação antiviral sobre os vírus herpes simplex tipos 1 e 2.

Uma vez que os vírus não crescem em meios artificiais, como as bactérias, é necessário recorrer a técnicas laboratoriais diferentes. O método mais utilizado nos estudos de vírus animais, *in vitro*, é a cultura de tecidos em monocamada que cresce em meio líquido num recipiente de fundo plano. Uma vez formado o tapete celular, as suas células são utilizadas como hospedeiras do vírus.

Assim, uma vez que aqui trabalhamos com células eucariotas, foram necessários cuidados acrescidos com a assepsia, para evitar a contaminação da linha celular, do meio de cultura e das placas contendo células em subcultura, preparadas para a produção de vírus, bem como das placas com células, previamente preparadas para fazer os ensaios com estes.

As porfirinas **1**, **11**, **17** e de **19** à **37** (ver anexos 2a e 2b) foram sintetizadas e caracterizadas por nós e foram usadas assim nos ensaios biológicos. Os compostos não-catiónicos **1**, **17**, de **19** a **31** e **34** foram dissolvidos em DMSO enquanto que os catiónicos **11**, **32**, **33** e de **35** a **37** foram dissolvidos em PBS. A partir destas soluções “stock”, mantidas no frigorífico e protegidas da luz, foram preparadas todas as outras mais diluídas por adição de meio DME (8% ou 2%) ou de PBS, consoante os testes.

Os estudos de actividade antiviral foram realizados em células de cultura Vero, uma linha celular onde estão adaptados os vírus herpes. Esta é uma linha contínua fibroblástica de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*, da American Type Culture Collection (ATCC).

Os vírus HSV tipo 1 *Angellotti* e HSV tipo 2, estirpe selvagem, foram igualmente obtidos da ATCC. Ambos os vírus foram brevemente apresentados na introdução deste capítulo.

A seguir, apresentamos as técnicas utilizadas nos ensaios com vírus, bem como os resultados obtidos. Os procedimentos detalhados de cada técnica encontram-se descritos na parte experimental dos ensaios biológicos.

### 3.5.1 Manutenção da linha celular e preparação de placas com células

Para trabalhar com linhas celulares, todos os cuidados para obter uma boa assepsia são fundamentais. Os meios, riquíssimos em nutrientes para a multiplicação das células, são também excelentes para o crescimento de microrganismos. Assim, um pequeno descuido neste princípio pode levar a infecções das células por bactérias ou fungos. Neste caso, há uma maior exigência na esterilidade do que a usada nos trabalhos com as bactérias. Assim, além da câmara de fluxo laminar vertical (fig.3.2), indispensável, tivemos o cuidado de, regularmente, desinfetar com álcool a área de trabalho, as mãos ou as luvas cirúrgicas; estas últimas quando se trabalhava com os vírus.



Figura 3.2 Câmara de fluxo laminar vertical, apresentando algum material usado em virologia.

As células Vero foram cultivadas em frascos de 75 ou 175 cm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub> ou T<sub>175</sub>) (fig. 3.3) com meio Eagle modificado por Dulbecco (DME) contendo 8% de soro fetal de vitela (FCS) na presença do antibiótico gentamicina. Foram mantidas numa incubadora sob atmosfera húmida, CO<sub>2</sub> a 5% e a 37 °C (fig. 3.4).

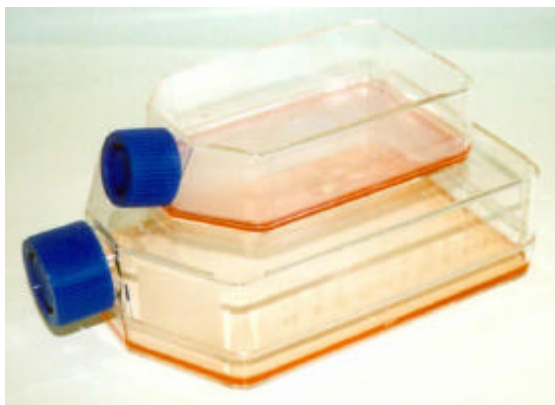


Figura 3.3 Frascos de 75 e 175 cm<sup>2</sup> com células e meio DME.



Figura 3.4 Incubadora de CO<sub>2</sub>, apresentando placas com células e meios.

Quando estas formam uma camada confluenta com cerca de 250 000 células/cm<sup>2</sup> têm de ser transferidas para outros frascos ou retirar parte delas do frasco de linha. Assim, as que forem transferidas para outros frascos ou as que se mantiverem podem-se desenvolver, caso contrário acabariam por morrer.

O número de células Vero viáveis existente em cada frasco foi determinado por quantificação directa numa câmara de Neubauer (hemocitómetro) com a ajuda de um microscópio óptico e do corante azul de tripiano (corante de exclusão, isto é, apenas cora as células mortas). Esta câmara comporta um determinado volume de suspensão, assim, contando o número de células vivas existentes na câmara, determinou-se a densidade celular viável existente na suspensão. Com este valor e conhecendo a taxa de crescimento das células Vero, determinou-se o número de células/volume de suspensão a transferir ou a manter no frasco para que a linha celular continue.

Com as restantes células preparámos: placas P<sub>150</sub> (150 mm de diâmetro) para a produção de vírus, placas com 96 poços para a determinação da concentração máxima não citotóxica e placas com 12, 24 e 48 poços para a realização dos ensaios com vírus. O tapete de células formado em cada poço foi conseguido pela passagem de um número apropriado destas, dois ou três dias antes do dia em que pretendíamos usar as placas teste, visto sabermos a taxa de crescimento das células.

Devemos aqui realçar que cada poço representa uma experiência individual.

### 3.5.2 Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos compostos

Como tivemos oportunidade de verificar na introdução deste capítulo, um antiviral deve ser capaz de inactivar o vírus sem destruir as células. É portanto, necessário começarmos por determinar a concentração máxima de composto que não afecta as células onde realizamos os testes.

Em placas com 96 poços (fig. 3.5), preparadas com células Vero em camada confluyente, adicionaram-se diferentes concentrações de droga preparadas em DME 2% (DME com 2% de FCS). Este meio menos rico serve apenas para manter as células. As células foram incubadas durante 48 horas e depois foram observadas ao microscópio. Após o período de incubação, o meio foi removido e adicionou-se o corante vital vermelho neutro a cada poço, deixando-se uma hora a incubar. Depois de lavar o excesso de corante com PBS, o corante que foi absorvido pelas células viáveis foi extraído por adição de igual volume de tampão etanol-Sorensen a cada poço. Usando uma aplicação da técnica de Finter,<sup>37</sup> baseada na absorção do corante vermelho neutro pelas células viáveis, os valores obtidos foram comparados com os obtidos nos controlos efectuados na ausência de droga. Assim, determinamos a partir de que concentração de droga não ocorria o efeito citotóxico das células (ver tabela 3.1). A absorvência registada é directamente proporcional às células vivas em cada poço, sendo a concentração máxima escolhida, a concentração mais elevada onde a média da absorvência é idêntica à dos controlos.

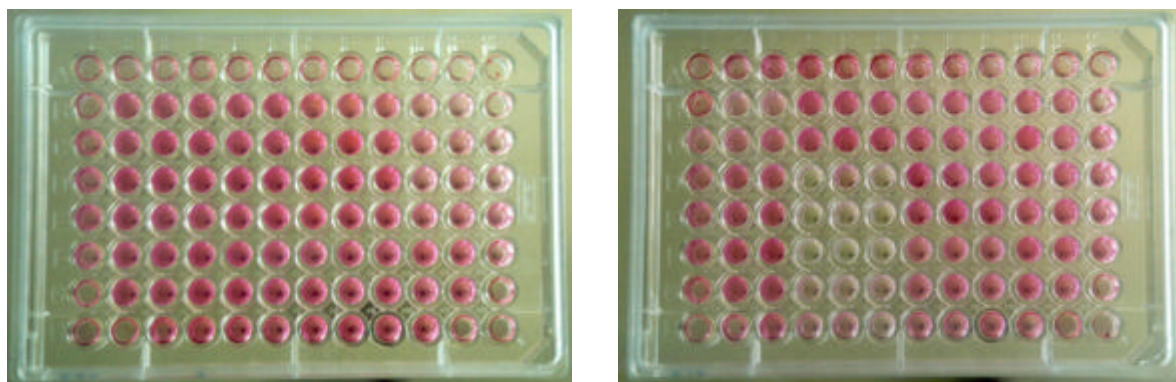


Figura 3.5 Placas de 96 poços com células coradas com vermelho neutro.



### 3.5.3 Produção de vírus

Os vírus utilizados nos testes foram produzidos a partir dos adquiridos, em geral em placas P<sub>150</sub> (fig. 3.6) com o tapete de células subconflente, que deste modo permitia uma melhor adsorção do vírus. Esta é a primeira etapa para a replicação dos vírus que infectam células animais, como os herpes, por exemplo. Estes, depois de adsorverem à superfície de uma célula susceptível, penetram no seu interior através da fusão do envelope viral com a membrana da célula, seguindo-se a sua multiplicação que leva à lise da célula, produzindo assim efeito citopático (morte das células de cultura causada pelo vírus, que é morfológicamente diferente para o HSV-1 e o HSV-2), como se pode observar por microscopia óptica invertida. Os viriões produzidos e libertados vão infectar as células vizinhas até um efeito citopático total, destruindo e descolando todas as células constituintes do tapete celular. Para manter as células depois da adsorção do vírus adicionou-se DME 2%.



Figura 3.6 Placa P<sub>150</sub> com células a produzir vírus herpes.

Quando se verificou um efeito citopático total, cerca de quarenta e oito horas após a infecção das células, o conteúdo da placa foi transferido para um tubo universal e a suspensão foi sujeita a centrifugação. Desta forma vimo-nos livres de algumas células bem como dos resíduos celulares das outras onde houve produção de vírus. O sobrenadante contendo o vírus extracelular foi recolhido e fez-se o controlo de esterilidade ao vírus produzido, ou seja, ver se estava contaminado com bactérias ou fungos. Para isso inoculou-se 1 mL de suspensão viral em meio BHI (meio de crescimento rápido de bactérias) e em meio Sabourand (meio de crescimento rápido de fungos).

### 3.5.4 Titulação de vírus

Para determinar o número de partículas infecciosas existentes numa determinada suspensão viral, é necessário preparar placas de 24 ou 48 poços com tapetes de células confluentes (ver preparação de placas com células). A técnica utilizada para esse efeito foi o método da formação de placas, onde as células são inoculadas com um determinado volume de suspensão viral nas diluições mais apropriadas, de entre  $10^0$ - $10^{-7}$ . Após adsorção do vírus, as células foram cobertas com DME 2% contendo Sephadex G50 a 2%. Deixou-se durante três dias a incubar, sendo as células fixadas por tratamento com uma solução de formaldeído e coradas com violeta de cristal.

Nas culturas celulares as células infectadas morrem e descolam-se dando origem a “buracos” no tapete celular, denominados placas de lise ou centros infecciosos. Se num poço as placas de lise forem contáveis, correspondem ao mesmo número de partículas infecciosas na suspensão viral titulada.

O gel de Sephadex assegura que os vírus produzidos na célula infectada, onde se encontra a placa de lise, não se possam difundir para outras células. Desta forma, evita-se a sobreposição de placas de lise.

As placas foram contadas por observação directa a olho nu ou com o auxílio de uma lupa no tapete celular corado de violeta de cristal. O título da suspensão viral foi determinado como sendo o número de placas de lise formadas por mililitro de suspensão (UFP/mL), tendo em conta o número de placas obtido, o volume do inóculo viral e o factor de diluição do mesmo.

### 3.5.5 Estudos de inactivação dos vírus na presença das drogas

#### 3.5.5.1 Efeito na formação de placas

O efeito na formação de placas consiste num ensaio rápido que permite testar se o composto, com uma determinada concentração, no nosso caso na CMNC, inibe a infecciosidade do vírus durante o ciclo viral. O ensaio não permite quantificar os vírus produzidos pelas células infectadas, mas antes verificar se o vírus em presença da droga

tem capacidade infecciosa ou não (fig 3.7). Com esta técnica foi possível realizar uma primeira avaliação da actividade antiviral das porfirinas

Para este efeito preparamos várias diluições do vírus, com e sem droga na CMNC em meio DME 2%. Inoculámos os vírus e depois da sua adsorção às células adicionámos o Sephadex preparado também com meio DME 2% na CMNC de cada droga, evitando assim a diluição da mesma.

O número de placas formadas pelos vírus com droga é comparado com o número de placas formadas pelos vírus sem droga, ou seja, o título do vírus com droga foi comparado com o título da suspensão viral sujeita às mesmas condições mas na ausência de droga. O método usado para a titulação encontra-se descrito em 3.8.6.

Os resultados vêm expressos como percentagem de redução de placas em relação ao controlo sem droga. Estes resultados são apresentados na tabela 3.1 e representam a média de pelo menos 2 experiências independentes.

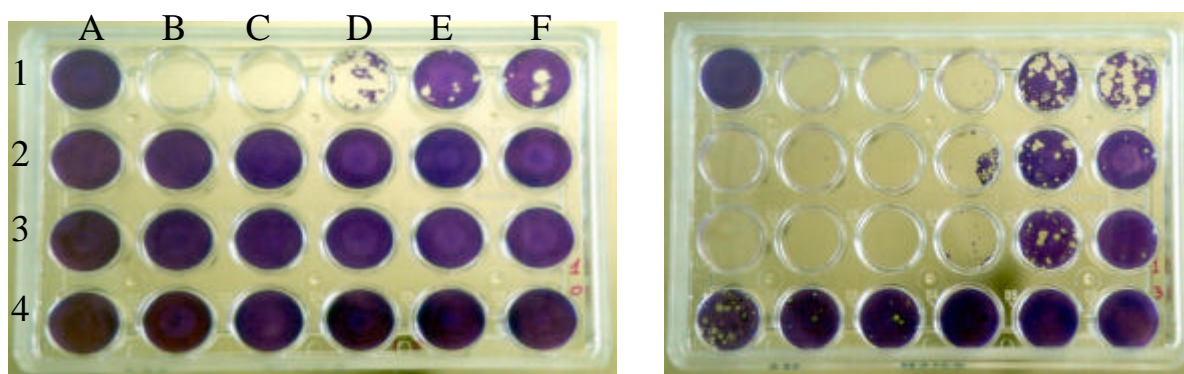


Figura 3.7 Fotos de placas de 24 poços da titulação de vírus e vírus com droga.

Para uma melhor interpretação das figuras apresentadas vamos descreve-las, ainda que brevemente.

No primeiro poço (1A) das placas temos um controlo de células (células com meio DME 2%)., Na mesma linha (1), tomando como exemplo a primeira placa, nos poços seguintes foram inoculados 100  $\mu$ L de determinadas diluições crescentes de suspensão viral ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ), que não esteve em contacto com droga (controlo de vírus). Nas outras 3 linhas temos o resultado da titulação do correspondente vírus, nas mesmas diluições, em contacto com as drogas **1**, **31**, **11** na CMNC (50  $\mu$ g/mL), respectivamente nas linhas 2, 3, e 4. Estas placa de vírus com droga apresentam uma inactivação viral da ordem dos 100% (tapete celular intacto).

Na segunda placa usou-se o mesmo procedimento, mas as drogas testadas nas linhas 2 e 3 apresentaram uma pequena inibição (células mortas e descoladas que desaparecem dos poços). No entanto, a droga testada na última linha apresenta um efeito inibitório bastante considerável, tendo em atenção que a concentração do vírus onde se formaram placas de lise é 10 000 vezes maior que a diluição do vírus controlo onde se podiam ver placas de lise. No entanto, esta diluição  $10^{-5}$  do vírus controlo mostrou-se pequena, não sendo por isso possível determinar o número de placas formadas por este.

### 3.5.5.2 Efeito no ciclo replicativo viral

Depois do efeito na formação de placas, foi investigado mais especificamente onde ocorria a inibição. Para começar fez-se o efeito no ciclo replicativo viral. Este teste permite-nos saber se na presença dos compostos as células produzem vírus ou se os vírus produzidos tinham ou não capacidade de infectar novas células. Assim, determinou-se o rendimento viral, ou seja, quantas partículas infecciosas se formaram na presença ou ausência do inibidor.

O efeito inibitório na replicação pode ser observado, qualitativamente, num microscópio óptico invertido pela não formação de efeito citopático nas células inoculadas com vírus mais droga. No entanto, pelo facto de não existir efeito citopático não significa que a droga inibiu a formação de vírus nas células, mas quase de certeza que impediu um dos seus passos para a formação de viriões livres.

Para estudar o efeito no ciclo replicativo viral procedeu-se a um pré-tratamento das células em camada subconfluente, em placas de 12 poços, com DME 2% contendo droga na CMNC. Após trinta minutos de incubação, procedeu-se à adsorção de uma suspensão de vírus preparada no mesmo meio com droga. Após a adsorção do vírus adicionou-se meio DME 2% com droga na CMNC. O vírus foi deixado a replicar durante vinte e quatro horas e o conteúdo de cada poço foi titulado pelo método descrito em 3.8.6.

Neste caso, comparamos as placas formadas por vírus replicados em células com droga com as placas de uma suspensão viral sujeita às mesmas condições na ausência de droga. Os resultados vêm expressos como percentagem de redução de placas em relação ao

controle sem droga e são apresentados na tabela 3.1 (os valores representam a média de, pelo menos, duas experiências independentes).

#### **3.5.5.3 Efeito directo ou virucida**

Para sabermos se a inibição que alguns compostos apresentaram no efeito de formação de placas era devido a um efeito directo sobre o vírus, determinou-se o efeito virucida. Este estudo permitiu saber se os compostos actuam directamente nos constituintes de superfície dos vírus, ou seja, se se ligavam ao vírus e o modificavam de forma a que estes perdessem a sua infecciosidade.

O efeito directo consistiu na incubação, durante uma hora num banho a 37 °C, de um sedimento de vírus ressuspenso em PBS com droga na CMNC. Após este tratamento com droga, o vírus foi de novo centrifugado para o sedimentar e remover deste modo a droga, ressuspenso em PBS e titulado pelo processo descrito em 3.8.6.

Quando se verifica inibição na formação de placas virais, muito provavelmente o efeito antiviral do composto é directo, isto é, bloqueia directamente os vírus não interferindo numa fase do ciclo replicativo viral. Se, pelo contrário, não houver efeito directo da droga no vírus, nem efeito na formação de placas virais, mas houver inibição da replicação viral, a inibição far-se-á durante a formação dos novos vírus, o que significará um efeito mais específico durante o ciclo viral.

O efeito directo das drogas sobre os vírus foi quantificado, comparando o número de partículas virais infecciosas (placas) depois do tratamento do vírus com droga, e um controlo sujeito ao mesmo procedimento sem droga. Os resultados vêm mais uma vez expressos em percentagem de redução de placas em relação ao controlo sem droga, e encontram-se apresentados na tabela 3.1, representando a média de, pelo menos, três experiências independentes.

### 3.5.6 Apresentação e discussão dos resultados obtidos

Como já foi referido, os valores da CMNC e os resultados das inibições virais obtidos pelos compostos porfirínicos (ver compilação das estruturas das porfirinas nos anexos 2a e 2b) sobre os dois vírus herpes estudados, encontram-se apresentados na (tab. 3.1).

Porf.	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Efeito na formação de placas		Efeito no ciclo replicativo		Efeito directo	
	<b>células Vero</b>	<b>HSV-1</b>	<b>HSV-2</b>	<b>HSV-1</b>	<b>HSV-2</b>	<b>HSV-1</b>	<b>HSV-2</b>
<b>17*</b>	30	20	40	99,99	40	0	0
<b>19*</b>	30	45	60	40	20	0	0
<b>20*</b>	15	0	0	100	100	—	—
<b>21</b>	50	0	0	41,7	33,3	—	—
<b>22</b>	50	0	0	50	14,3	—	—
<b>23</b>	50	0	0	80	92,9	66,7	9,1
<b>24*</b>	40	—	0	0	50	—	—
<b>25*</b>	50	—	20	60	80	—	—
<b>26*</b>	15	—	0	90	99,9	60	50
<b>27*</b>	5	—	0	30	30	99	50
<b>28*</b>	50	—	0	30	30	30	50
<b>29*</b>	10	—	30	90	99	50	99
<b>1</b>	50	100	100	100	100	100	—
<b>30</b>	1,5	40	16,7	55,6	97	98,7	81,8
<b>31</b>	50	100	100	100	100	100	—
<b>11</b>	50	100	100	100	100	100	—
<b>32</b>	1,5	65	50	97,3	96,6	99,9	90,9
<b>33*</b>	80	—	99,9	—	80	—	99
<b>34</b>	50	100	99,3	100	100	100	99,9
<b>35</b>	50	95	91,7	99,8	100	100	99,9
<b>36*</b>	80	100	100	99	60	—	99
<b>37*</b>	70	100	100	—	—	—	—

Tabela 3.1 Valores de concentração máxima não citotóxica em células Vero, e de inibição viral nos efeitos estudados, em percentagem de inibição em relação ao controlo sem droga e sem inibição.

\* Estes compostos foram testados por Filipa Mendonça, que gentilmente cedeu os seus resultados para uma análise global dos valores de inibição obtidos com as porfirinas sintetizadas.

Como já tivemos oportunidade de referir, os compostos a usar como antivirais devem ser moléculas que numa concentração não citotóxica inibam uma função específica no vírus sem danificar a célula hospedeira. Foi a partir desse princípio que realizámos os ensaios para determinar a CMNC nas células de trabalho, e como se pode observar dos resultados (tab. 3.1) esta é específica de cada composto, não sendo à partida possível estabelecer qualquer relacionamento entre a toxicidade e as diferentes porfirinas estudadas.

No geral, apresentaram uma toxicidade relativamente baixa nas células Vero. No entanto, pode-se verificar que as porfirinas **30** e **32** apresentam, comparativamente com as outras, uma forte toxicidade (1,5 µg/mL) não se tendo ainda encontrado uma justificação para esse facto.

Para se poder mais facilmente analisar os resultados obtidos, os valores de inibição observados nos diferentes efeitos virais encontram-se apresentados, separadamente, nos gráficos 3.1, 3.2 e 3.3.

No que diz respeito à percentagem de inibição observada no efeito de formação de placas virais (gráfico 3.1) pode-se verificar que as porfirinas sem grupos piridilo (**17**, **19-29**), de um modo geral, apresentaram baixo efeito antiviral. É ainda de referir que estas porfirinas ligadas a unidades glicosídicas com os grupos hidroxilos livres (**20**, **23**, **26** e **29**) não trouxeram nenhuma melhoria na inibição viral, neste teste. A porfirina **20**, por exemplo, até apresentou uma inibição menor do que as suas precursoras.

Contrariamente as porfirinas com três ou quatro grupos piridilo, neutras ou catiónicas, (**1**, **11**, **31**, **34-37**) apresentaram uma inibição de 100% nos dois tipos de vírus, impedindo-os de formar placas virais. No entanto, as porfirinas **30** e **32** apresentaram menor efeito inibitório, sendo de notar que a unidade glicosídica nestas se encontra protegida, e que também apresentam uma CMNC muito mais baixa do que as outras porfirinas.

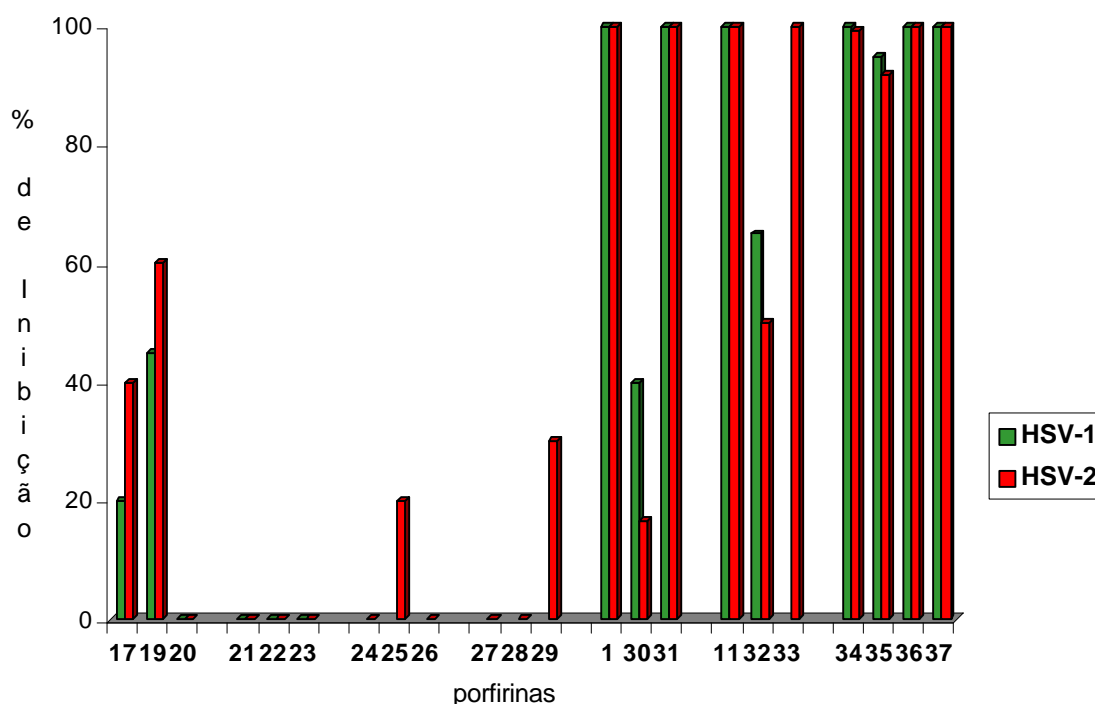


Gráfico 3.1 Efeito das diferentes porfirinas na formação de placas virais

No que diz respeito aos resultados obtidos no efeito de replicação viral (gráfico 3.2), a situação é bastante diferente do teste anterior. As porfirinas acopladas à unidade glicosídica com grupos hidroxilo livres (**20**, **23**, **26** e **29**) apresentaram uma inibição no ciclo replicativo muito maior que as suas precursoras (inibições superiores a 90%, sobre os dois vírus herpes testados). Isto é, a formação de partículas virais infecciosas em presença destas drogas é muitíssimo menor, quando comparamos com as porfirinas com a unidade glicosídica protegida (**19**, **22**, **25** e **28**) ou sem unidade glicosídica (**17**, **21**, **24** e **27**). Pode-se no entanto verificar que a porfiringa **17** apresenta uma forte inibição ( $\approx 100\%$ ) sobre o HSV-1, mas uma fraca inibição sobre o HSV-2.

As *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirinas **24**, **25** e **26** apresentaram um efeito inibitório crescente, da porfiringa base **24** para a que se encontrava ligada à unidade glicosídica com os grupos OH livres **26**. Pode-se ainda observar que a porfiringa **24** não inibiu o HSV-1.

Quanto às porfirinas neutras com três grupos piridilo (**1**, **30** e **31**) mostraram ser excelentes inibidores da replicação viral, fazendo ênfase para a **1** e para a **31**, porfirinas



sem unidade glicosídica ou com essa unidade com os grupos hidroxilo livres, respectivamente. As porfirinas catiónicas (**11**, **32** e **33**) mostraram uma inibição decrescente, isto é, maior inibição para a porfirina sem unidade glicosídica, e menor inibição para a porfirina com a unidade glicosídica desprotegida. Neste caso, o comportamento da porfirina com a unidade glicosídica desprotegida é o oposto do que tínhamos observado para as porfirinas sem grupos piridilo.

As porfirinas tetra-catiónicas testadas neste efeito (**35** e **36**) apresentaram também uma forte inibição no ciclo replicativo de ambos os vírus testados.

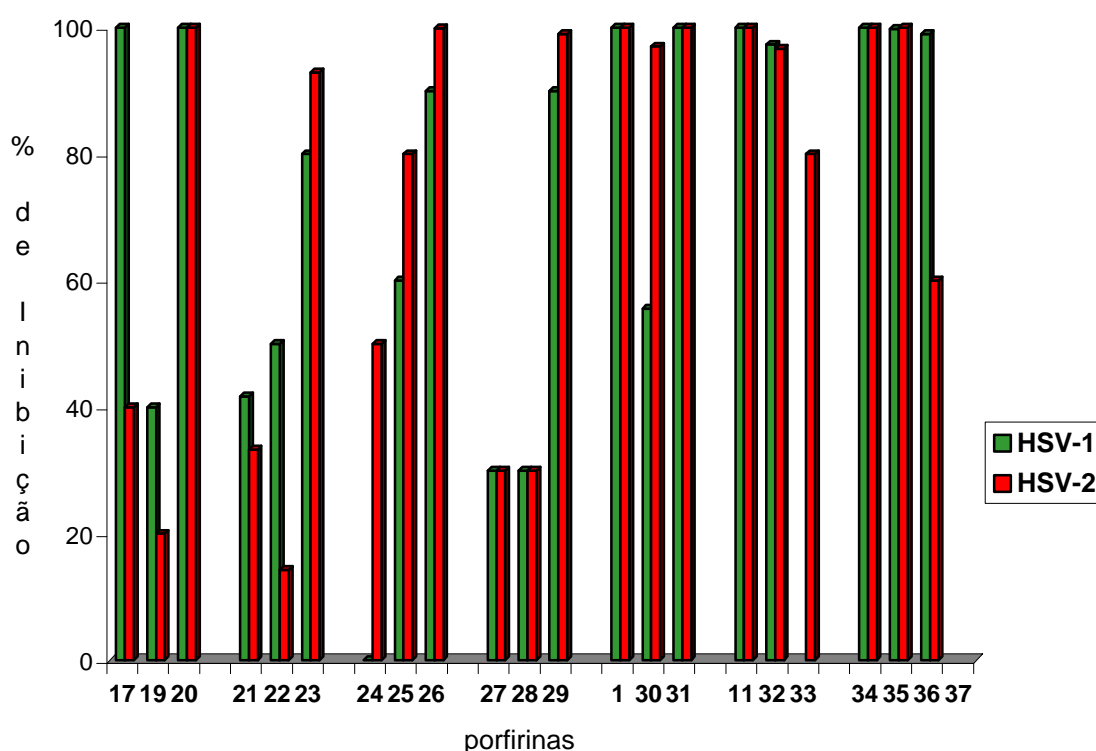


Gráfico 3.2 Efeito das diferentes porfirinas na replicação dos vírus herpes

Para terminar, apresentamos os valores de inibição viral, que cada composto apresentou directamente sobre o vírus.

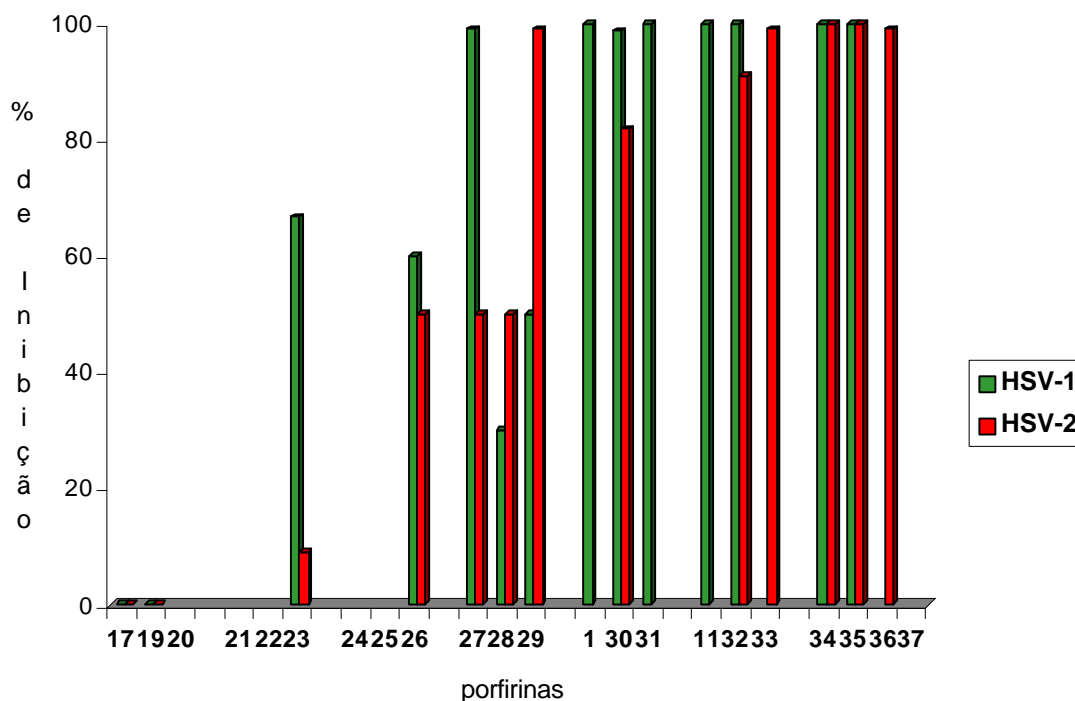


Gráfico 3.3 Efeito directo das diferentes porfirinas nos vírus herpes

Apesar de não se terem ensaiado todos os compostos, podemos verificar no gráfico 3.3 que alguns deles inibem os vírus directamente impedindo dessa forma que estes infectem as células.

As porfirinas sem grupos piridilo parecem ser mais específicas na inibição viral, isto é, parecem inibir um passo pós-adsorção viral. Primeiro, porque não apresentaram efeito directo significativo nos viriões, nem efeito na formação de placas virais. Segundo, porque testes posteriores demonstraram que o efeito inibitório não é nesta primeira fase do ciclo viral, mas numa fase do ciclo replicativo.

Entre as duas séries das porfirinas de partida com função ácido carboxílico, **1** e **27**, que apresentam a mesma unidade glicosídica, podemos verificar que todas as porfirinas da série piridilo apresentaram uma forte inibição. Uma vez que o que as distingue são os três grupos piridilo, pode-se concluir que os grupos piridilo exercem uma forte influência nos resultados de inactivação viral destas porfirinas. Estas porfirinas neutras e catiónicas com

grupos piridilo apresentaram mesmo os melhores resultados obtidos neste teste. Os resultados deste estudo, principalmente nestas últimas explica os valores de inibição obtidos nos dois ensaios anteriores. Apesar da inibição não depender de um único efeito, pode-se dizer que, no caso das porfirinas com grupos piridilo, grande parte dos viriões são inactivados por efeito directo. Os vírus já não penetram nas células, ou se penetram não apresentam poder infeccioso.

Estudos de replicação realizados por Filipa Mendonça com o composto **20**, mostraram que se durante a fase de adsorção as placas fossem expostas a uma lâmpada de halogénio ( $\lambda > 500$  nm), o poder inibitório do composto aumentava em uma ordem de grandeza, comparando com experiência idêntica em condições de pouca luz (luz da câmara desligada e a sala com pouca luz). Estes estudos revelaram que a luz potencia o efeito antiviral dos compostos. Pensa-se que o mecanismo de fotoinactivação viral envolve os passos de adsorção e penetração na célula pois uma vez que o processo é mediado pelo oxigénio singuleto, é provável que as glicoproteínas do envelope, envolvidas nestas fases do ciclo, sejam os alvos mais sensíveis à toxicidade destes compostos.<sup>38</sup> No entanto, os ensaios realizados no “escuro” não excluíram a possibilidade de os compostos apresentarem efeito inibitório na ausência de luz.<sup>18</sup> Na “ausência” de luz, relativamente a condições normais de trabalho, continuou-se a verificar inibição viral, ainda que inferior. Estes resultados são importantes porque sendo assim, podem ser usados em concentrações muito inferiores, aquando da terapia ou da inactivação directa dos agentes infecciosos.

### 3.6 Conclusões

Relativamente à parte de síntese de porfirinas com unidades glicosídicas, podemos afirmar que com uma escolha acertada dos grupos funcionais na porfirina de partida e o açúcar certo, conseguem-se acoplamentos com muito bons rendimentos. Verificamos isso tanto para as *meso*-tetra-arilporfirinas substituídas como para as *meso*-di-arilporfirinas substituídas.

As porfirinas com grupos piridilo nas posições *meso* permitiram obter porfirinas catiónicas solúveis em meios aquosos.

Relativamente aos ensaios biológicos, os resultados obtidos na determinação da CMNC indicam-nos que, em geral, as porfirinas são compostos com uma baixa toxicidade.

Dum modo geral as porfirinas neutras sem grupos piridilo não apresentam inibição nas placas virais nem efeito directo nos vírus, mas inibem significativamente a replicação viral.

As porfirinas sem grupos piridilo e com as unidades glicosídicas com os grupos hidroxilo livres (**20**, **23**, **26** e **29**) apresentaram efeito antiviral significativo, em grande parte a nível do ciclo replicativo (gráfico 3.2). No entanto, as porfirinas precursoras destes compostos não apresentaram efeito antiviral significativo, com excepção dos compostos **17** (efeito replicativo) e **27** (efeito directo) sobre o HSV-1. Ou seja, as porfirinas destas séries com os grupos hidroxilo das unidades glicosídicas desprotegidas originaram, em geral, um forte aumento da inibição viral.

As porfirinas com três grupos piridilo, catiónicas e não-catiónicas apresentaram uma forte inibição viral nos três ensaios, com excepção da **30** e da **32** no efeito de formação de placas, para os dois vírus. Comparando os resultados das porfirinas da série tri-piridilo neutras com os das correspondentes catiónicas, podemos verificar que todas elas apresentam excelentes resultados, com excepção da **30** e a sua congénere metilada **32**, como já tínhamos referido.

Quanto às porfirinas tetra-catiónicas, estas apresentaram, também, excelentes resultados de inibição viral, como já tínhamos analisado.

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que as porfirinas de uma maneira geral actuam de forma idêntica sobre os dois vírus, o que seria de esperar, já que se tratam de vírus relativamente semelhantes.

Neste momento, não nos é possível concluir quanto às vantagens ou inconvenientes da unidade glicosídica nas porfirinas com grupos piridilo, uma vez que os resultados foram idênticos para as porfirinas com ou sem açúcar. Não quer dizer que a concentração mínima para obter um bom efeito não possa ser bem menor no caso das porfirinas acopladas a açúcares. Esses estudos ainda não foram realizados.

Quanto às porfirinas catiónicas também são necessários estudos complementares para poder dizer que a cationização aumenta ou não o efeito antiviral, porque as porfirinas não catiónicas destas séries apresentam igualmente grande inibição viral.

Os estudos de inactivação viral demonstraram a possibilidade destes compostos poderem vir a pertencer a novas formulações de medicamentos anti-herpéticos, uma vez que os vírus já criaram resistências aos poucos princípios activos que se encontram no mercado.<sup>39,40</sup>

Pelo facto de a exposição à luz aumentar o poder antiviral dos compostos testados, podemos associar o carácter fotoexcitável destes compostos, para criar um efeito fotodinâmico sobre os vírus, para os fotoinactivar.

A combinação de compostos com forte acção em diferentes efeitos, pode originar uma mistura capaz de inibir os vírus em todas as fases do seu ciclo viral.

Podemos concluir que todas as inibições apresentadas ocorrem sem citotoxicidade e muitos mecanismos de acção podem ser discutidos, desde o efeito directo nos viriões até à interferência no seu ciclo replicativo, tendo como alvo, provavelmente, o ADN viral.

Estão descritos vários tipos de interacções, como as interacções electrostáticas dos grupos periféricos do anel porfirínico nas partículas virais, e as mudanças de conformação das proteínas virais induzidas pela estrutura central em anel destes compostos.<sup>41</sup>

Também já foi demonstrado que porfirinas catiónicas e outras, ligam-se ao ADN<sup>42</sup> e recentemente foi esclarecido o mecanismo de acção das porfirinas sobre o ADN.<sup>43</sup>

Nos nossos trabalhos ainda não foram realizados estudos conducentes à avaliação do mecanismo de acção destes compostos. No entanto podemos concluir que as porfirinas com grupos piridilo, têm uma forte acção antiviral nos três testes estudados o que nos sugere que estes compostos podem por um lado ligar-se às proteínas do envelope e depois actuar numa fase posterior, tendo efeito na replicação do ADN viral.

As porfirinas sem grupos piridilo devem actuar a nível do ADN, uma vez que não apresentam inibição directa, nem interferem com a adsorção do vírus.

O potencial destes compostos na inactivação destes vírus é enorme, mas estudar os seus efeitos citotóxicos nas diferentes células sanguíneas é da maior importância, uma vez que os limites de segurança ainda são desconhecidos. Além da boa actividade que um composto possa ter, extensos estudos de toxicidade são um dos pré-requisitos para qualquer protocolo futuro.

### 3.7 Parte experimental da síntese

#### 3.7.1 Reagentes, solventes e equipamento

Os reagentes comerciais, de diversas marcas, foram usados sem qualquer purificação prévia uma vez que os seus graus de pureza assim o permitiam.

Os solventes utilizados nas transformações e cristalizações efectuadas eram analiticamente puros ou foram, sempre que necessário, purificados:

- a dimetilformamida foi seca com sulfato de magnésio anidro;
- o dimetilsulfóxido foi seco, por aquecimento a refluxo, sobre hidreto de cálcio e destilado em seguida a pressão normal;
- o metanol foi seco, por aquecimento a refluxo, sobre metóxido de magnésio, na presença de iodo, e destilado em seguida;
- a piridina foi seca, por aquecimento a refluxo, sobre lentilhas de hidróxido de sódio e destilada em seguida;
- o tetra-hidrofurano foi seco, por aquecimento a refluxo, sobre potássio metálico e benzofenona. Quando a mistura adquiriu coloração azul procedeu-se à sua destilação;
- o tolueno foi seco com fio de sódio e passado por alumina neutra activada imediatamente antes de ser utilizado.

Os solventes utilizados nas operações de purificação foram previamente destilados e passados, antes de serem usados, por uma coluna de alumina neutra activada.

A evolução das reacções foi seguida por TLC, usando pequenas folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60 ou de sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Algumas cromatografias de camada fina, depois da eluição dos compostos, foram observadas à luz ultravioleta a 254 ou 366 nm, reveladas com bromo, e com ácido sulfúrico concentrado com posterior aquecimento na estufa (para os açúcares).

Nas cromatografias de coluna utilizou-se sílica gel 60, da Merck, de granulometria 70-230 mesh.

As cromatografias de camada fina preparativas foram efectuadas em placas de vidro, previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 (Merck), com uma espessura de 0,5 mm, e activadas na estufa a 100 °C durante 8 horas.

Os espectros de RMN foram registados num aparelho Bruker AMX 300. Os solventes deuterados utilizados são referenciados em cada espectro. Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foi usado como padrão interno o TMS ( $\delta = 0$  ppm). Nos espectros de  $^{19}\text{F}$  foi usado como referência o  $\text{C}_6\text{F}_6$  considerando o sinal deste a  $\delta -163$  ppm, tendo como referência primária o  $\text{CFCl}_3$ , que corresponde a um  $\delta$  de 0 ppm.

Os espectros de massa em FAB (positivo) foram registados num espectrómetro VG AutoSpecQ, utilizando como matrizes o álcool 3-nitrobenzílico (NBA) e o tioglicerol.

Os espectros de massa de alta resolução e as microanálises elementares foram efectuadas no Instituto du Pin (Bordéus).

Os espectros de ultravioleta-visível foram registados num espectrofotómetro Jasco V-560.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de placa aquecida Reichert Thermovar e não foram corrigidos.

#### **3.7.2 Síntese de novos fotossensibilizadores porfirínicos acoplados a unidades glicosídicas**

##### **3.7.2.1 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a glucose**

###### **a) Síntese de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (17)**

A uma mistura de ácido acético glacial (200 mL) e nitrobenzeno (150 mL) em refluxo, adicionou-se 4-hidroxibenzaldeído (1,07 g, 8,77 mmol, 1,2 eq.) e benzaldeído

(2,20 mL, 21,7 mmol, 3 eq.). Após a dissolução do 4-hidroxibenzaldeído, adicionou-se pirrol (2,00 mL, 28,9 mmol, 4 eq.), gota a gota, com a ajuda de um funil de carga. A mistura deixou-se a agitar em refluxo (130 °C) durante uma hora. Findo esse tempo deixou-se arrefecer e quando o banho de óleo se encontrava a 40 °C iniciou-se a destilação do ácido acético glacial e do nitrobenzeno, a pressão reduzida, até à secura.

Retomou-se o resíduo em clorofórmio e cromatografou-se directamente numa coluna de sílica gel usando inicialmente, como eluente, uma mistura clorofórmio/éter de petróleo (1:1). Com este eluente obteve-se uma primeira fracção que foi identificada como sendo a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP). Usando clorofórmio como eluente recolheu-se uma segunda fracção que, após remoção do solvente, foi cristalizada em clorofórmio/éter de petróleo. Foram obtidos uns cristais de cor vermelha, correspondente ao produto desejado (300 mg, 7%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.78 (s, 2H, NH), 7.15 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 7.72-7.78 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.06 (d, *J*= 8.5 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.20-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.84-8.88 (m, 8H, β-H); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 113.6, 119.8, 120.1, 126.7, 127.7, 131.0, 131.1, 134.5, 134.7, 135.7, 142.2, 155.4; **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 631 (M+H)<sup>+</sup>;

#### **b) Síntese de 5-[4-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosiloxi)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (19)**

A uma solução da porfirina **17** (101 mg, 160 μmol) em diclorometano seco (150 mL), adicionou-se sulfato de sódio anidro (1,84 g, 13,0 mmol, 81,2 eq.), carbonato de prata (0,95 g, 3,4 mmol, 21,2 eq.) e 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranosose (1,00 g, 2,43 mmol, 15 eq.). A mistura reaccional foi mantida em agitação à temperatura ambiente, no escuro e sob atmosfera de azoto.

A reacção foi monitorizada por TLC e ao fim de 24 horas verificou-se que quase toda a porfirina de partida tinha sido consumida. Filtrou-se a mistura reaccional e a fase orgânica foi lavada com água (2 x 50 mL) e extraída com diclorometano. Esta solução, depois de seca com sulfato de sódio anidro e concentrada no evaporador rotativo, foi cromatografada em coluna de sílica. A primeira fracção foi identificada como sendo o complexo de prata da porfirina de partida. A segunda fracção contendo a porfirina desejada



e o respectivo complexo de prata foi tratada, após remoção do eluente, com ácido trifluoroacético (TFA) (5 mL). Esta mistura foi mantida em agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se clorofórmio (5 mL) e após mais 5 minutos de agitação adicionou-se uma solução saturada de carbonato de sódio. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido no evaporador rotativo. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia de coluna usando clorofórmio como eluente. O composto foi cristalizado em clorofórmio/éter de petróleo obtendo-se uns cristais vermelhos acastanhados (101 mg, 66%). **p.f.:** >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.79 (s, 2H, NH), 2.10, 2.11, 2.12, 2.22 (4s, 12H,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 4.06 (ddd,  $J$ = 9.6, 5.4, 2.4 Hz, 1H, Glc-H5), 4.30 (dd,  $J$ = 12.3, 2.4 Hz, 1H, Glc-H6), 4.42 (dd,  $J$ = 12.3, 5.4 Hz, 1H, Glc-H6), 5.30 (t,  $J$ = 9.6 Hz, 1H, Glc-H4), 5.42-5.50 (m, 3H, Glc-H1, 2, 3), 7.38 (d,  $J$ = 8.7 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 7.73-7.79 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.14 (d,  $J$ = 8.7 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.20-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.85 (s, 8H,  $\beta$ -H); **RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.6 ( $\underline{\text{CH}_3\text{CO}_2}$ ), 20.7 ( $\underline{\text{CH}_3\text{CO}_2}$ ), 20.8 (2 x  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 62.1 (Glc-C6), 68.4, 71.4, 72.3, 72.9 (Glc-C2, 3, 4, 5), 99.2 (Glc-C1), 115.0, 119.2, 120.2, 126.7, 127.7, 131.2, 134.5, 135.6, 137.3, 142.1, 156.6, 169.5 (2 x  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 170.3 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 170.6 ( $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ); **EM FAB $^+$**   $m/z$ : 961 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

### c) Síntese de 5-(4- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)fenil-10,15,20-trifenilporfirina (20)

A uma solução da porfirina **19** (24,9 mg, 25,9  $\mu\text{mol}$ ) em diclorometano (5,76 mL) e metanol (5,76 mL) adicionou-se metóxido de sódio (0,1  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) em metanol (57,6  $\mu\text{L}$ , 5,76  $\mu\text{mol}$ , 0,22 eq.). A mistura reaccional foi mantida em agitação à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e ao abrigo da luz. Ao fim de 6 horas verificou-se por TLC que a reacção estava praticamente completa. Terminou-se a reacção adicionando água e a mistura resultante foi extraída com diclorometano. A solução orgânica foi lavada segunda vez com água e seca com sulfato de sódio anidro. Após remoção do solvente o produto foi cristalizado em clorofórmio/éter de petróleo, obtendo-se um sólido vermelho acastanhado (16,4 mg, 80%). **p.f.:** >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : -2.92 (s, 2H, NH), 3.52-3.57 (m, 4H, Glc-OH), 3.59-3.61 (m, 2H, Glc-H), 4.74 (s largo, 1H, Glc-H), 5.14 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 1H, Glc-H), 5.23 (s largo, 2H, Glc-H), 5.55 (s, 1H, Glc-H), 7.48 (d,  $J$ = 8.3 Hz,

2H, 5-Ar-*m*-H), 7.84 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.14 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.22 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.83-8.88 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN**  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 60.8 (Glc-C6), 69.8, 73.5, 76.7, 77.2 (Glc-C2, 3, 4, 5), 100.5 (Glc-C1), 114.6, 119.9, 120.0, 127.0, 128.1, 131.4, 134.2, 134.6, 135.3, 141.2, 157.5; **EM FAB**<sup>+</sup>  $m/z$ : 793 (M+H)<sup>+</sup>

### 3.7.2.2 Acoplamento de 5-(4-hidroxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose

#### a) Síntese de 5-[4-(pentafluorofeniloxi)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (21)

A uma suspensão da porfirina **17** (50,0 mg, 80,9  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (2 mL) adicionou-se hidreto de sódio em excesso. A mistura foi mantida em agitação a 70 °C, sob atmosfera de azoto, durante aproximadamente 10 minutos. A cor da solução passou de vermelho para azul esverdeado. A esta solução adicionou-se hexafluorobenzeno (1 mL, 8,7 mmol, 107 eq.) e ao fim de 4 horas adicionou-se clorofórmio, água e uma solução saturada de ácido cítrico para neutralizar. A fase orgânica foi separada, lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada à secua no evaporador rotativo. O resíduo foi então retomado em clorofórmio, cromatografado em coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio/éter de petróleo (70:30). A porfirina obtida (55 mg, 85%) foi cristalizada em clorofórmio/metanol com formação de cristais vermelhos acastanhados. **p.f.**: 295-296 °C; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.80 (s, 2H, NH), 7.33 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 7.73-7.78 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.17 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.20-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.82-8.87 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN**  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 113.7, 118.6, 120.25, 120.3, 126.7, 127.7, 131.2, 134.6, 135.7, 138.0, 142.1, 157.0; **RMN**  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -158.10 (t,  $J = 21.2$  Hz, 2F, Ar-*m*-F), -155.88 (t,  $J = 21.2$  Hz, 1F, Ar-*p*-F), -149.91 (d,  $J = 16.9$  Hz, 2F, Ar-*o*-F); **Análise elementar**: Encontrado (%): C, 70.36; H, 3.91; N, 6.24; Calculado para  $\text{C}_{50}\text{H}_{29}\text{F}_5\text{N}_4\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C, 70.58; H, 4.15; N, 6.58; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em  $\text{CHCl}_3$ : 420 (5.71), 516 (4.30), 551 (3.92), 591 (3.76), 646 (3.63); **EM FAB**<sup>+</sup>  $m/z$ : 797 (M+H)<sup>+</sup>

**b) Síntese de 5-{4-[4-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxi) tetrafluorofeniloxi]fenil}-10,15,20-trifenilporfirina (22)**

Dissolveu-se a 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose (4,5 mg, 17,3  $\mu$ mol) e a 5-(4-pentafluorofeniloxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (20,0 mg, 25,1  $\mu$ mol, 1,45 eq.) em DMF seca (2,5 mL). A mistura foi deixada a agitar a 70 °C durante aproximadamente 10 minutos até à dissolução total dos reagentes. Em seguida adicionou-se hidreto de sódio em excesso ( $\approx$  25 mg), observando-se uma alteração de cor, de vermelho a azul esverdeado. A mistura reaccional foi mantida à mesma temperatura durante 1,5 horas, ao abrigo da luz e sob atmosfera de azoto. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico, lavada com água (2x100 mL) e extraída com clorofórmio. Depois de se secar a solução orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporado o solvente, cromatografou-se o resíduo por coluna de sílica gel, usando como eluente clorofórmio/éter de petróleo (1:1). O produto (12,5 mg, 70%) foi obtido por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.:** 131-133 °C; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.80 (s, 2H, NH), 1.33, 1.35, 1.47, 1.55 [4s, 12H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 4.20 (dt,  $J$ = 5.7, 2.0 Hz, 1H, Gal-H5), 4.34 (dd,  $J$ = 5.2, 2.6 Hz, 1H, Gal-H2), 4.37 (dd,  $J$ = 8.0, 2.0 Hz, 1H, Gal-H4), 4.47 (d largo,  $J$ = 5.7 Hz, 2H, Gal-H6), 4.66 (dd,  $J$ = 8.0, 2.6 Hz, 1H, Gal-H3), 5.54 (d,  $J$ = 5.2 Hz, 1H, Gal-H1), 7.35 (d,  $J$ = 8.6 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 7.73-7.80 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.16 (d,  $J$ = 8.6 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.20-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.84-8.86 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN**  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24.4, 24.9, 25.9, 25.9 [4 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 67.0 (Gal-C6), 70.4, 70.7, 71.0 (Gal-C2, 3, 4, 5), 96.2 (Gal-C1), 108.8, 109.6 [2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 113.6, 118.9, 120.2, 126.7, 127.7, 134.6, 135.6, 137.5, 142.1, 157.3; **RMN**  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -152.40 (d,  $J$ = 22.6 Hz, 2F, Ar-*m*-F), -151.91 (d,  $J$ = 22.6 Hz, 2F, Ar-*o*-F); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 71.82; H, 5.01; N, 5.07; Calculado para C<sub>62</sub>H<sub>48</sub>F<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: C, 71.81; H, 4.67; N, 5.40; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em CHCl<sub>3</sub>: 420 (5.67), 516 (4.25), 551 (3.89), 590 (3.73), 646 (3.56); **EM FAB**<sup>+</sup>  $m/z$ : 1037 (M+H)<sup>+</sup>

**c) Síntese de 5-[4-[4-( $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosil-6-oxi)tetrafluorofeniloxi]fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (23)**

Uma solução da porfirina **22** (15,0 mg, 14,5  $\mu$ mol) em ácido trifluoroacético/água (9:1) (3 mL) foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se à mistura clorofórmio (10 mL) e água (20 mL) e em seguida neutralizou-se com uma solução saturada de carbonato de sódio. A fase orgânica foi então separada, lavada com água (100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O produto (12,9 mg, 93%) foi obtido directamente por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**: 215-216 °C; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.94 (s largo, 2H, NH), 3.63-5.42 (m, 11H, Gal-H e OH), 6.90-8.03 (m, 19H, 5,10,15,20-Ar-H), 8.52-8.66 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN**  $^{19}\text{F}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -153.38 (s largo, 2F, Ar-*m*-F), -151.26 (s largo, 2F, Ar-*o*-F); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em  $\text{CHCl}_3$ : 420 (5.66), 518 (4.24), 551 (3.98), 591 (3.76), 646 (3.55); **EM FAB**<sup>+</sup>  $m/z$ : 957 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

**3.7.2.3 Acoplamento de *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina a galactose**

**a) Síntese de 5-[4-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxi)tetrafluorofenil]-10,15,20-tris(pentafluorofenil)porfirina (25)**

Dissolveu-se a 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosilose (5,5 mg, 21,1  $\mu$ mol) e a *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (30,0 mg, 30,8  $\mu$ mol, 1,46 eq.) em tolueno seco (2,5 mL). Adicionou-se hidreto de sódio em excesso ( $\approx$  25 mg) à mistura anterior e aqueceu-se a 120°C, sob atmosfera de azoto e com agitação, durante 24 horas. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, a mistura reaccional foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico e extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água (2x100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Após concentração o resíduo foi cromatografado por coluna de sílica gel, usando como eluente clorofórmio/éter de petróleo (1:1). O produto (10,1 mg, 40%) foi obtido por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**: 171-174 °C; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.92 (s, 2H, NH), 1.44, 1.45, 1.56, 1.67 [4s, 12H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 4.40-4.53 (m, 3H, Gal-H), 4.75-4.78 (m, 3H, Gal-H), 5.70 (d,  $J$ = 3.0

Hz, 1H, Gal-H1), 8.89-9.02 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -157.95 a -157.75 (m, 6F, 10,15,20-Ar-*m*-F), -152.62 (dd,  $J = 22.6, 8.5$  Hz, 2F, 5-Ar-*m*-F), -147.90 a -147.73 (m, 3F, 10,15,20-Ar-*p*-F), -135.80 a -135.68 (m, 2F, 5-Ar-*o*-F), -133.01 a -132.90 (m, 6F, 10,15,20-Ar-*o*-F); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em  $\text{CHCl}_3$ : 414 (5.54), 507 (4.39), 585 (3.89); **EM ARFAB $^+$**  m/z: Encontrado: 1215.1866; Calculado para  $\text{C}_{56}\text{H}_{30}\text{F}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$ : 1215.1862 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

**b) Síntese de 5-[4-( $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosil-6-oxi)tetrafluorofenil]-10,15,20-tris(pentafluorofenil)porfirina (26)**

Uma solução da porfirina **25** (20,0 mg, 16,5  $\mu\text{mol}$ ) em ácido trifluoroacético/água (9:1) (4 mL) foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se clorofórmio (20 mL) e água (20 mL) à mistura, tendo-se neutralizado de seguida com uma solução saturada de carbonato de sódio. A fase orgânica foi então separada, lavada com água (100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O produto (16,8 mg, 90%) foi obtido por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**:  $>300$  °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -3.04, -3.01 (2s, 2H, NH), 3.05-3.55, 4.23-4.53, 4.79-5.10 (3m, 10H, Gal-H e OH), 5.70 (s, 1H, Gal-H1), 8.73-8.89 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN  $^{19}\text{F}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -158.41 a -157.82 (m, 6F, 10,15,20-Ar-*m*-F), -153.58 a -153.21 (m, 2F, 5-Ar-*m*-F), -148.37 a -147.78 (m, 3F, 10,15,20-Ar-*p*-F), -135.00 a -134.91 (m, 2F, 5-Ar-*o*-F), -133.44 a -133.00 (m, 6F, 10,15,20-Ar-*o*-F); **Análise elementar**: Encontrado (%): C, 52.91; H, 2.40; N, 4.57; Calculado para  $\text{C}_{50}\text{H}_{21}\text{F}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$ : C, 52.92; H, 1.87; N, 4.94; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em  $\text{CHCl}_3$ : 414 (5.56), 507 (4.40), 585 (3.89); **EM FAB $^+$**  m/z: 1135 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

**3.7.2.4 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a galactose**

**a) Síntese de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (27)**

A uma mistura de ácido acético glacial (200 mL) e nitrobenzeno (150 mL) em refluxo, adicionou-se 4-formilbenzoato de metilo (1,44 g, 8,77 mmol, 1,2 eq.) e

benzaldeído (2,20 mL, 21,7 mmol, 3 eq.). Após a dissolução do 4-formilbenzoato de metilo, adicionou-se o pirrol (2,00 mL, 28,9 mmol, 4 eq.), gota a gota, com a ajuda de um funil de carga. A mistura foi agitada em refluxo (130 °C) durante uma hora e depois deixou-se arrefecer. Quando o banho de óleo se encontrava a 40 °C iniciou-se a destilação, a pressão reduzida, do ácido acético glacial e do nitrobenzeno até à secura. O resíduo foi retomado em clorofórmio e cromatografado numa coluna de sílica gel usando como eluente clorofórmio/éter de petróleo (1:1). A primeira fracção eluída foi identificada como sendo a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP). Usando o mesmo eluente, recolheu-se uma segunda fracção que após remoção do solvente foi cristalizada em clorofórmio/metanol. Obteve-se um sólido de cor púrpura (618 mg, 13%) correspondente ao éster metílico da porfirina **27**.

**p.f.:** 268-270 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.79 (s, 2H, NH), 4.11 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.72-7.81 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.20-8.22 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.31 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.44 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.78-8.87 (m, 8H, β-H); **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 673 (M+H)<sup>+</sup>

A uma solução da porfirina anterior (162 mg, 0,241 mmol) em THF (4 mL) e piridina (0.8 mL), adicionou-se hidróxido de potássio (4,00 g, 71,3 mmol) dissolvido em metanol (40 mL). A mistura foi mantida em agitação durante 38 horas em refluxo (100 °C) e ao abrigo da luz. Após este período a transformação estava completa procedendo-se em seguida, ao arrefecimento da mistura e sua neutralização com uma solução saturada de ácido cítrico. A suspensão resultante foi extraída com clorofórmio/metanol (85:15) e a solução orgânica foi então lavada com água (2x100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Depois de remover o solvente, a porfirina **27** foi recristalizada em clorofórmio/metanol (85:15)/éter de petróleo, obtendo-se cristais avermelhados (151 mg, 95%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.73-7.80 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.21-8.24 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.32 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.46 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.87 (s largo, 8H, β-H); **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm (log ε) em CHCl<sub>3</sub>: 418 (5.78), 513 (4.40), 549 (4.07), 588 (3.94), 649 (3.81); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 82.22; H, 4.77; N, 8.25; Calculado para C<sub>45</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: C, 82.05; H, 4.59; N, 8.51

**b) Síntese de 5-[4-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (28)**

Dissolveu-se a 6-iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil (176 mg, 475  $\mu$ mol, 6,2 eq.), a 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-trifenilporfirina (50 mg, 76  $\mu$ mol,) e carbonato de potássio (125 mg, 0,9 mmol, 11,9 eq.) em DMF seca (10 mL). Manteve-se a mistura em agitação no escuro a 100 °C, sob atmosfera de azoto, durante aproximadamente 30 horas. A mistura reaccional, depois de arrefecer à temperatura ambiente, foi extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água (2x100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O resíduo foi levado à secura, retomado em clorofórmio e cromatografado por coluna de sílica gel usando clorofórmio como eluente. O produto (34 mg, 50%) foi obtido puro por cristalização em clorofórmio/metanol. **p.f.:** >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.79 (s, 2H, NH), 1.38, 1.42, 1.55, 1.63 [4s, 12H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 4.35-4.49, 4.61-4.75 (2m, 6H, Gal-H2, 3, 4, 5, 6), 5.66 (d,  $J$ = 5.1 Hz, 1H, Gal-H1), 7.73-7.79 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*- e *p*-H), 8.20-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.30 (d,  $J$ = 8.4 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.45 (d,  $J$ = 8.4 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.78-8.88 (m, 8H,  $\beta$ -H); **RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 24.6, 25.0, 26.0, 26.1 [4 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 64.2 (Gal-C6), 66.2 (Gal-C5), 70.6, 70.8 (Gal-C3, 4), 71.2 (Gal-C2), 96.4 (Gal-C1), 108.9, 109.8 [2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 118.5, 120.4, 120.5, 126.7, 127.8, 128.0, 129.4, 134.5, 142.0, 147.1, 166.7 (CO); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em  $\text{CHCl}_3$ : 420 (5.73), 516 (4.30), 551 (3.92), 591 (3.74), 646 (3.60); **EM FAB $^+$**   $m/z$ : 902 ( $\text{M}+2\text{H}$ ) $^+$

**c) Síntese de 5-[4-( $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-trifenilporfirina (29)**

Uma solução da porfirina **28** (15,0 mg, 16,5  $\mu$ mol) em ácido trifluoroacético/água (9:1) (3 mL) foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se clorofórmio (20 mL) e água (20 mL) à mistura, tendo-se neutralizado de seguida com uma solução saturada de carbonato de sódio. A mistura foi extraída com clorofórmio/metanol (85:15) e a fase orgânica foi então lavada com água (100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O produto (12,9 mg, 94%) foi obtido puro por cristalização em clorofórmio/metanol (85:15)/éter de petróleo. **p.f.:** >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**

(CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 3.52-3.70, 3.90-4.15, 4.50-4.68, 4.68-4.75 e 5.32 (4m e 1d,  $J$ = 3.2 Hz, 11H, Gal-H e OH), 7.74-7.81 (m, 9H, 10,15,20-Ar-*m*-H e *p*-H), 8.21-8.23 (m, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.33 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.47 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.88 (s largo, 8H,  $\beta$ -H); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em CHCl<sub>3</sub>/MeOH (85:15): 420 (5.52), 518 (4.12), 551 (3.75), 590 (3.60), 645 (3.41); **EM ARFAB<sup>+</sup>**  $m/z$ : Encontrado: 821.2988; Calculado para C<sub>51</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>: 821.2975 (M+H)<sup>+</sup>

### 3.7.2.5 Acoplamento de 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina a galactose

#### a) Síntese de 5-[4-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (30)

Dissolveu-se a 1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose (150 mg, 0,58 mmol, 14,6 eq.) e a porfirina **5** (30,0 mg, 39,6  $\mu$ mol) em tolueno seco (2,5 mL). À mistura anterior adicionou-se hidreto de sódio em excesso ( $\approx$  25 mg). A mistura reaccional foi mantida em agitação à temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto durante 90 minutos. Depois adicionou-se água à mistura reaccional e neutralizou-se com uma solução saturada de ácido cítrico. A fase aquosa foi então extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi ainda lavada com água (100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. Após concentração, o produto foi purificado por cromatografia de coluna usando clorofórmio/acetona (1:1) como eluente. A porfirina **30** (27,5 mg, 77%) foi obtida pura por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**: >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : -2.90 (s, 2H, NH), 1.39, 1.43, 1.56, 1.63 (4s, 12H, CH<sub>3</sub>), 4.36-4.48, 4.60-4.76 (2m, 6H, Gal-H<sub>2</sub>, 3, 4, 5, 6), 5.67 (d,  $J$ = 5.0 Hz, 1H, Gal-H<sub>1</sub>), 8.17 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.29 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.48 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.84-8.89 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.06 (d,  $J$ = 5.7 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 24.6, 25.0, 26.0, 26.1 [4 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 64.4 (Gal-C<sub>6</sub>), 66.2 (Gal-C<sub>5</sub>), 70.5, 70.8 (Gal-C<sub>3</sub>, 4), 71.2 (Gal-C<sub>2</sub>), 96.4 (Gal-C<sub>1</sub>), 108.9, 109.8 [2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 117.4, 117.6, 120.1, 128.2, 129.3, 129.8, 131.4, 134.5, 146.3, 148.4, 149.9, 166.5 (CO); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em CHCl<sub>3</sub>: 420 (5.63), 514 (4.26), 548



(3.66), 589 (3.67), 644 (2.96); **EM ARFAB<sup>+</sup>** m/z: Encontrado: 904.3433; Calculado para C<sub>54</sub>H<sub>46</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>: 904.3459 (M+H)<sup>+</sup>

**b) Síntese de 5-[4-( $\alpha/\beta$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-tri(4-piridil)porfirina (31)**

Procedimento idêntico aos anteriores para a hidrólise dos grupos isopropilideno.

Uma solução da porfirina **30** (20 mg, 22,1  $\mu$ mol) em ácido trifluoroacético/água (9:1) (4 mL) foi mantida em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se clorofórmio (20 mL) e água (20 mL) à mistura, tendo-se neutralizado de seguida com uma solução saturada de carbonato de sódio. A mistura foi extraída com clorofórmio/metanol (85:15), e a fase orgânica foi então lavada com água (100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro. O produto (16,5 mg, 91%) foi obtido puro por cristalização em clorofórmio/metanol (85:15)/éter de petróleo. **p.f.**: >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : -3.05 (s, 2H, NH), 3.63-4.01, 4.33-4.57 (2m, 7H, Gal-H e OH), 4.66-4.88 (m, 2H, Gal-H e OH), 5.02-5.06, 5.30-5.34 (2m, 1H, Gal-H $\alpha$  e  $\beta$ ), 6.37-6.38 e 6.72 (m e d,  $J$ = 6.7 Hz, 1H, Gal-OH $\alpha$  e  $\beta$ ), 8.23 (d,  $J$ = 4.5 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*o*-H), 8.31-8.43 (m, 4H, 5-Ar-*m*- e *o*-H), 8.87-8.89 (m, 8H,  $\beta$ -H), 9.02 (d,  $J$ = 4.5 Hz, 6H, 10, 15, 20-Ar-*m*-H); **UV-Vis.**  $\lambda$ max. nm (log  $\epsilon$ ) em CHCl<sub>3</sub>/MeOH (85:15): 420 (5.47), 514 (4.14), 548 (3.63), 589 (3.63), 644 (3.16); **EM ARFAB<sup>+</sup>** m/z: Encontrado: 824.2813; Calculado para C<sub>48</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>: 824.2833 (M+H)<sup>+</sup>

**3.7.2.5.1 Metilação dos compostos 30 e 31**

**a) Síntese do triiodeto de 5-[4-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (32)**

A uma solução da porfirina **30** (25,0 mg, 27,7  $\mu$ mol) em DMF seca (5 mL) adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (1 mL, 16,1 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 3 horas a 40 °C num balão equipado com

condensador. Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por um funil com algodão e lavou-se com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vácuo para dar um pó castanho (33,5 mg, 91%). **p.f.:** 272-274 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: -3.05 (s, 2H, NH), 1.33, 1.38, 1.46, 1.54 [4s, 12H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 4.22-4.35 (m, 1H, Gal-H), 4.47-4.57 (m, 4H, Gal-H), 4.71 (s, 10H, 3 x CH<sub>3</sub> e Gal-H), 5.58 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Gal-Hα), 8.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 9.00-9.17 (m, 14H, 10,15,20-Ar-*o*- e β-H), 9.48 (d, *J* = 4.6 Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **RMN <sup>13</sup>C** (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 24.5, 25.0, 26.0, 26.1 [4 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 47.96 (3 x CH<sub>3</sub>), 64.3 (Gal-C6), 65.7 (Gal-C5), 69.8, 70.2 (Gal-C3, 4), 70.5 (Gal-C2), 95.8 (Gal-C1), 108.2, 108.9 [2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 114.9, 115.5, 121.4, 128.1, 129.6, 132.2, 134.7, 144.3, 145.4, 156.4, 156.5, 165.9 (CO); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 47.34; H, 4.12; N, 6.82; Calculado para C<sub>57</sub>H<sub>54</sub>I<sub>3</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>·6H<sub>2</sub>O: C, 47.61; H, 4.63; N, 6.82; **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm (log ε) em DMSO: 426 (5.58), 517 (4.38), 552 (3.93), 589 (3.94), 644 (3.47); **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 948 (M-3I)<sup>+</sup>

**b) Síntese do triiodeto de 5-[4-(α/β-D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)fenil]-10,15,20-tris(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (33)**

A uma suspensão da porfirina **31** (25,0 mg, 30,4 μmol) em DMF seca (5 mL) adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (1 mL, 16,1 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 3 horas a 40 °C num balão equipado com condensador. Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por um funil com algodão e lavou-se com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vácuo para dar um pó castanho escuro (34,0 mg, 90%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: -3.05 (s, 2H, NH), 3.65-4.15, 4.31-4.63 (2m, 7H, Gal-H e OH), 4.72 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 4.77-4.90 (m, 2H, Gal-H e OH), 5.02-5.07, 5.28-5.34 (2m, 1H, Gal-Hα e β),

6.33-6.38 e 6.69 (m e d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, Gal-OH $\alpha$   $\beta$  ), 8.40 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 5-Ar-*o*-H), 8.46 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, 5-Ar-*m*-H), 8.99-9.18 (m, 14H, 10,15,20-Ar-*o*- e  $\beta$ -H), 9.48 (d,  $J = 6.6$  Hz, 6H, 10,15,20-Ar-*m*-H); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 46.04; H, 4.24; N, 7.22; Calculado para  $C_{51}H_{46}I_3N_7O_7 \cdot 5H_2O$ : C, 45.72; H, 4.21; N, 7.32; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm (log  $\epsilon$ ) em DMSO/H<sub>2</sub>O (9:1): 426 (5.43), 519 (4.24), 552 (3.80), 590 (3.80), 644 (3.33); **EM FAB<sup>+</sup>** m/z: 868 (M-3I)<sup>+</sup>

### 3.7.3 Cationização de *meso*-tetrapiridilporfirina

#### a) Síntese do tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (35)

A uma suspensão da porfirina **34** (100 mg, 162  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (20 mL), adicionou-se um largo excesso de iodeto de metilo (4 mL, 64,3 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 5 horas a 40 °C num balão equipado com condensador. Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado por um funil com algodão e lavou-se com éter etílico. O resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto metilado foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vácuo, para dar um pó castanho avermelhado (180 mg, 94%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : -3.12 (s, 2H, NH), 4.73 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 9.00 (d,  $J = 6.5$  Hz, 8H, Ar-*o*-H), 9.21 (s, 8H,  $\beta$ -H), 9.49 (d,  $J = 6.5$  Hz, 8H, Ar-*m*-H); **EM FAB<sup>+</sup>** m/z: 678 (M-4I)<sup>+</sup>

#### b) Síntese do tetraiodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-pentilpiridínio-4-il)porfirina (36)

A uma suspensão da porfirina **34** (50,0 mg, 80,9  $\mu\text{mol}$ ) em DMF (10 mL) adicionou-se um largo excesso de 1-iodopentano (4 mL, 30,3 mmol). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 12 horas a 100 °C. Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado e lavou-se com

éter etílico. O resíduo foi então retomado em metanol e, após concentração, foi reprecipitado por adição de éter etílico. O produto alquilado foi filtrado, lavado com éter etílico e seco sob vácuo para dar um pó castanho avermelhado (85 mg, 75%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: -3.10 (s, 2H, NH), 1.04 (t, *J*= 7.0 Hz, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.50-1.63 [m, 16H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>], 2.28-2.33 [m, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>], 4.96 (t, *J*= 7.3 Hz, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 9.03 (d, *J*= 6.3 Hz, 8H, Ar-*o*-H), 9.26 (s, 8H, β-H), 9.58 (d, *J*= 6.3 Hz, 8H, Ar-*m*-H); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 51.06; H, 5.22; N, 7.91; Calculado para C<sub>60</sub>H<sub>70</sub>I<sub>4</sub>N<sub>8</sub>: C, 51.08; H, 5.00; N, 7.94; **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm (log ε) em DMSO: 427 (5.44), 519 (4.27), 551 (3.80), 589 (3.83), 644 (3.25); **EM FAB<sup>+</sup>** *m/z*: 904 (M+H-4I)<sup>+</sup>

### c) Síntese do tetrabrometo de 5,10,15,20-tetra-(*N*-dodecilpiridínio-4-il)porfirina (37)

A uma suspensão da porfirina **34** (25,0 mg, 40,5 μmol) em DMF (10 mL) adicionou-se um largo excesso de 1-bromododecano (0,50 mL, 2,08 mmol, 51,4 eq.). A mistura reaccional foi mantida em agitação durante 12 horas em refluxo (160 °C). Terminado este período, arrefeceu-se a mistura e precipitou-se o produto com éter etílico. Filtrou-se o precipitado e lavou-se com éter etílico e com clorofórmio. O resíduo foi então retomado em clorofórmio/metanol (85:15) e, após concentração, foi reprecipitado com acetona. O produto assim obtido foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vácuo para dar um pó avermelhado (45,7 mg, 70%). **p.f.:** >300 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: -3.11 (s, 2H, NH), 0.86 (t, *J*= 6.9 Hz, 12H, dodecil-CH<sub>3</sub>), 1.27-1.60 (m, 72H, dodecil-CH<sub>2</sub>, dos carbonos 3 a 11), 2.28 (s, 8H, dodecil-CH<sub>2</sub>-2), 4.96 (t, *J*= 6.9 Hz, 8H, dodecil-CH<sub>2</sub>-1), 9.03 (d, *J*= 6.4 Hz, 8H, Ar-*o*-H), 9.24 (s, 8H, β-H), 9.59 (d, *J*= 6.4 Hz, 8H, Ar-*m*-H); **Análise elementar:** Encontrado (%): C, 61.26; H, 7.76; N, 6.53; Calculado para C<sub>88</sub>H<sub>126</sub>Br<sub>4</sub>N<sub>8</sub>.6H<sub>2</sub>O: C, 61.32; H, 8.07; N, 6.50; **UV-Vis** λ<sub>máx.</sub> (log ε) em DMSO/H<sub>2</sub>O (9:1): 427 (5.44), 519 (4.29), 552 (3.84), 590 (3.86), 644 (3.30)

### **3.7.4 Acoplamento de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina a açúcares**

#### **3.7.4.1 Síntese de 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina**

##### **a) Síntese do dipirrometano 38**

A uma mistura de metanol (5 mL) e ácido acético (15 mL), após borbulhar azoto, adicionou-se paraformaldeído (109 mg, 3,63 mmol). Após a dissolução do paraformaldeído, adicionou-se pirrol (10,0 mL, 144 mmol, 39,7 eq) com a ajuda de um funil de carga. A mistura foi deixada a agitar à temperatura ambiente durante 22 horas, sob atmosfera de azoto. Findo esse tempo diluiu-se a mistura com diclorometano (50 mL) e lavou-se com água. A fase orgânica foi neutralizada com uma solução aquosa de hidróxido de potássio ( $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ ; 2x50 mL) e foi novamente lavada com água (2x50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida.

O pirrol em excesso foi removido à temperatura ambiente, usando-se para o efeito uma bomba de vazio com uma “trap” arrefecida em azoto líquido onde se recolheu o pirrol. Este pirrol está puro e pode ser usado novamente. Obteve-se assim um resíduo oleoso preto cujo TLC, depois de eluir em diclorometano e exposto a vapores de bromo, apresentou três bandas que correspondem a pirrol (banda preta), a dipirrometano (banda rosa) e a tripirrometano (banda vermelha).

##### **b) Síntese do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinogénio (39)**

O resíduo anterior, sem qualquer purificação, foi dissolvido em clorofórmio (120 mL). Depois de borbulhar azoto, adicionou-se 3-metoxibenzaldeído (0,22 mL, 1,8 mmol) e trifluoreto de boro em éter etílico ( $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ). A reacção decorreu à temperatura ambiente durante 16 horas sob atmosfera de azoto. A reacção foi seguida por TLC e por espectroscopia de visível, registando-se o aumento de absorvência ao comprimento de onda correspondente ao porfirinogénio ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ). A reacção foi dada por terminada quando se observou o desaparecimento da banda cor-de-rosa por TLC, que como já foi referido corresponde ao dipirrometano.

### c) Oxidação do porfirinogénio 39

À mistura reaccional anterior adicionou-se um excesso de acetato de zinco (1,85 g) dissolvido em metanol (3 mL) e deixou-se a agitar uns 15 minutos. Em seguida adicionou-se DDQ (600 mg, 2,64 mol) e refluxou-se a mistura, com agitação, durante 8 horas. A reacção de oxidação do porfirinogénio foi seguida por espectroscopia de visível e por TLC.

Terminada a reacção, evaporaram-se os solventes à secura e retomou-se o resíduo em clorofórmio (50 mL). A mistura foi lavada primeiro com uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3x150 mL), e depois com água (2x150 mL). A fase orgânica, depois de seca com sulfato de sódio anidro, foi concentrada e cromatografada por coluna de sílica gel usando como eluente o tolueno. Foram obtidas 4 manchas: a primeira foi identificada como sendo o 5-(3-metoxifenil)porfirinatozinco(II), a segunda o 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatozinco(II) **40**, a terceira a 5-(3-metoxifenil)porfirina e a quarta a 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina **41**.

### d) Descomplexação do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatozinco(II) (**40**)

Uma solução da porfirina **40** (100 mg) em diclorometano/ácido trifluoroacético (9:1) (30 mL) foi mantida em agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se água à mistura, tendo-se neutralizado de seguida com uma solução saturada de carbonato de sódio. A fase orgânica foi então separada, lavada com água (2x100 mL) e seca com sulfato de sódio anidro.

O produto **41** aqui obtido foi adicionado ao obtido da coluna de cromatografia e cristalizado em diclorometano/éter de petróleo (65 mg, rendimento total de 13%). **p.f.:** >300 °C; **RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ: -3.12 (s, 2H, NH), 4.02 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 7.36 (dd, *J*= 7.9, 2.4 Hz, 2H, 5,15-Ar-*p*-H), 7.69 (t, *J*= 7.9 Hz, 2H, 5,15-Ar-*m*-H), 7.84-7.88 (m, 4H, 5,15-Ar-*o*-H), 9.12, 9.38 (2d, *J*= 4.6 Hz, 8H, β-H), 10.30 (s, 2H, *meso*-H); **RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 55.6 (2 x OCH<sub>3</sub>), 105.3, 113.5, 118.8, 120.8, 127.8, 127.9, 131.0, 131.6, 142.7, 145.3, 147.1, 158.3; **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm em CHCl<sub>3</sub>: 406, 501, 535, 573, 628; **EM FAB**<sup>+</sup>: 523 (M+H)<sup>+</sup>

### 3.7.4.2 Funcionalização da 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirina

#### 3.7.4.2.1 Formilação em condições de Vilsmeier

##### a) Síntese do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatóníquel(II) (**42**)

A uma solução da porfirina **41** (50,0 mg, 95,8  $\mu$ mol) em clorofórmio (15 mL) e metanol (7,5 mL), adicionou-se acetato de níquel tetra-hidratado (200 mg, 0,804 mmol). A mistura foi mantida em agitação durante 2 dias em refluxo, adicionando-se com o decorrer da reacção mais acetato de níquel (2x200 mg). A mistura foi lavada com água, extraída com clorofórmio e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O produto **42** (52 mg, 94%) foi obtido por cristalização em diclorometano/éter de petróleo. **p.f.:** >300 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.97 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.28-7.32 (m, 2H, 5,15-Ar-*p*-H), 7.59-7.69 (m, 6H, 5,15-Ar-*o* e *m*-H), 8.98, 9.18 (2d,  $J$ = 4.8 Hz, 8H,  $\beta$ -H), 9.92 (s, 2H, *meso*-H); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 400, 514, 546; **EM FAB $^+$** : 578 ( $\text{M}^{+}$ )

##### b) Síntese do 5,15-bis(3-metoxifenil)porfirinatocobre(II) (**43**)

Procedimento idêntico ao anterior, mas em vez de se usar acetato de níquel usou-se acetato de cobre e a reacção decorreu em apenas um dia.

A uma solução da porfirina **41** (50,0 mg, 95,8  $\mu$ mol) em clorofórmio (15 mL) e metanol (7,5 mL), adicionou-se acetato de cobre mono-hidratado (100 mg, 0,5 mmol). A porfirina **43** (53 mg, 95%) foi obtida por cristalização em diclorometano/éter de petróleo. **p.f.:** >300 °C; **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 403, 526, 560

##### c) Síntese do 5-formil-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatóníquel(II) (**44**)

A uma solução da porfirina **42** (50,0 mg, 86,5  $\mu$ mol) em clorofórmio seco (20 mL) adicionou-se  $\text{POCl}_3$  (0,83 mL) e DMF (0,83 mL). A mistura reaccional foi mantida em

agitação durante 8 horas a 40 °C. Terminado este período arrefeceu-se a mistura e adicionou-se uma solução saturada de carbonato de sódio (30 mL). A hidrólise do intermediário decorreu à temperatura ambiente durante uma noite. A mistura foi lavada com água, extraída com clorofórmio, e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada. A mistura foi cromatografada em coluna de sílica usando-se tolueno como eluente. Após remoção do tolueno, a porfirina **44** (41,4 mg, 79%) foi obtida por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.:** 235-237 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.94 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 7.24-7.28 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.48-7.60 (m, 6H, 10,20-Ar-*o* e *m*-H), 8.69 (d, *J*=4.8 Hz, 2H, β-H), 8.86 (d, *J*= 5.2 Hz, 2H, β-H), 8.91 (d, *J*=4.8 Hz, 2H, β-H), 9.54 (s, 1H, *meso*-H), 9.75 (d, *J*= 5.2 Hz, 2H, β-H), 11.99 (s, 1H, CHO); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 55.4 (2 x OCH<sub>3</sub>), 106.2, 108.4, 113.6, 119.6, 120.1, 126.5, 127.9, 130.4, 132.3, 133.1, 135.2, 140.9, 141.2, 141.7, 143.9, 144.1, 158.2, 193.0 (CHO); **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm em CHCl<sub>3</sub>: 417, 545, 590; **EM FAB<sup>+</sup>**: 607 (M+H)<sup>+</sup>

#### d) Síntese do 5-formil-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatocobre(II) (**45**)

A porfirina **45** foi preparada de modo semelhante à anterior, tendo-se obtido com um rendimento de 86%. **p.f.:** >280 °C; **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm em CHCl<sub>3</sub>: 416, 547, 590

### 3.7.4.2.2 Descomplexação das porfirinas formiladas

#### a) Descomplexação do 5-formil-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatoníquel(II) (**44**)

A uma solução da porfirina **44** (10,0 mg, 16,5 μmol) em ácido trifluoroacético (3 mL) foi adicionado ácido sulfúrico comercial (0,3 mL) e a mistura resultante foi mantida em agitação durante 4 minutos à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se clorofórmio (5 mL) à mistura, e passados 30 segundos adicionou-se água (10 mL). A mistura foi neutralizada com uma solução saturada de carbonato de sódio e extraída com clorofórmio. A fase orgânica foi lavada com água, seca por sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi cromatografado em coluna de



sílica usando tolueno como eluente. A porfirina **46** foi cristalizada em clorofórmio/éter de petróleo, obtendo-se uns cristais castanhos (6 mg, 66%). **p.f.:** >280 °C; **RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>) δ: -2.51 (s, 2H, NH), 4.01 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 7.35-7.39 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.68 (t, *J*= 7.8 Hz, 2H, 10,20-Ar-*m*-H), 7.75-7.79 (m, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 8.91 (d, *J*= 4.6 Hz, 2H, β-H), 9.09 (d, *J*= 4.9 Hz, 2H, β-H), 9.27 (d, *J*= 4.6 Hz, 2H, β-H), 10.05 (d, *J*= 4.9 Hz, 2H, β-H), 10.21 (s, 1H, *meso*-H), 12.55 (s, 1H, CHO); **RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 55.5 (2 x OCH<sub>3</sub>), 108.1, 109.9, 113.8, 120.5, 121.9, 127.5, 127.8, 128.7, 131.3, 133.9, 142.5, 158.1, 195.3 (CHO); **UV-Vis.** λ<sub>máx.</sub> nm em CHCl<sub>3</sub>: 422, 521, 560, 593, 648; **EM FAB<sup>+</sup>**: 551 (M+H)<sup>+</sup>

#### b) Descomplexação do 5-formil-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatocobre(II) (**45**)

A uma solução de **45** (50 mg, 81,8 μmol) em diclorometano (10 mL) adicionou-se uma mistura de ácido sulfúrico em diclorometano (40%, 10 mL). A mistura foi mantida em agitação durante apenas 1 minuto à temperatura ambiente, uma vez que a descomplexação foi imediata. Após este período adicionou-se água (10 mL) à mistura, tendo-se neutralizando de seguida com uma solução saturada de carbonato de sódio. A mistura foi extraída com clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com água, seca por sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo obtido foi cromatografado em coluna de sílica usando tolueno como eluente. A porfirina **46** foi cristalizada em clorofórmio/éter de petróleo, obtendo-se uns cristais castanhos (19,5 mg, 43%).

#### 3.7.4.2.3 Reacção de Wittig e remoção do grupo *t*-butilo

##### a) Síntese do 5-[2-(*t*-butoxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatóníquel(II) (**47**)

A uma solução da porfirina **44** (20,0 mg, 33,0 μmol) em diclorometano (8 mL), adicionou-se [(*t*-butoxicarbonil)metileno]trifenilfosforano (55 mg, 0,15 mmol, 4,5 eq.). A solução foi mantida em agitação durante 6,5 horas em refluxo. Após este período deu-se a reacção por terminada, a mistura foi arrefecida, lavada com água e extraída com

diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia rápida em coluna de sílica, usando diclorometano como eluente. O produto (22,5 mg, 97%) foi obtido por cristalização em diclorometano/metanol. **p.f.:** 175-178 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.66 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.94 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.27 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ), 7.27-7.29 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.53-7.64 (m, 6H, 10,20-Ar-*o* e *m*-H), 8.83 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 8.89 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.05 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.41 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.69 (s, 1H, *meso*-H), 9.86 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 420, 535; **EM FAB $^+$** : 704 ( $\text{M}^{+\cdot}$ )

#### b) Síntese da 5-[2-(*t*-butoxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina (48)

Procedimento idêntico ao anterior, com excepção do tempo de reacção, que nesta foi de 24 horas. **p.f.:** 246-248 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.90 (s, 2H, NH), 1.74 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 4.02 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.74 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ), 7.35-7.39 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.69 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H, 10,20-Ar-*m*-H), 7.79-7.84 (m, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 9.01 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.03 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.30 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.55 (d,  $J = 4.7$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 10.19 (s, 1H, *meso*-H), 10.23 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 420, 516, 554, 591, 649; **EM FAB $^+$** : 649 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$

#### c) Síntese do 5-(2-carboxietenil)-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinato níquel(II) (49)

A porfirina **49** foi preparada de modo semelhante à porfirina **50**, tendo sido apenas necessário adicionar clorofórmio à mistura, devido à baixa solubilidade do complexo **47** no ácido fórmico. O produto também foi obtido directamente por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo, com um rendimento de 96%. **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.96 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.38 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ), 7.28-7.30 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.54-7.62 (m, 6H, 10,20-Ar-*o* e *m*-H), 8.84 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 8.92 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.08 (d,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.42 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.73 (s, 1H, *meso*-H),

10.05 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H,  $\underline{\text{CH}}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 421, 534; **EM FAB<sup>+</sup>**: 648 ( $\text{M}^+$ )

#### d) Síntese da 5-(2-carboxietenil)-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina (50)

Uma solução da porfirina **48** (10 mg, 15,4  $\mu\text{mol}$ ) em ácido fórmico (10 mL) foi mantida em agitação durante 7 horas à temperatura ambiente. Após este período adicionou-se clorofórmio e água à mistura e em seguida neutralizou-se com uma solução saturada de carbonato de sódio. A mistura foi então extraída com clorofórmio, a fase orgânica foi lavada com água, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a pressão reduzida. O produto (8,8 mg, 96%) foi obtido por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**: 250-252 °C; **RMN <sup>1</sup>H** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.80 (s, 2H, NH), 4.08 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.93 (d,  $J = 15.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\underline{\text{CH}}\text{CO}_2\text{H}$ ), 7.43 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.75 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, 10,20-Ar-*m*-H), 7.85-7.90 (m, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 9.07, 9.11, 9.37, 9.62 (4d,  $J = 4.6$  Hz, 8H,  $\beta$ -H), 10.27 (s, 1H, *meso*-H), 10.52 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H,  $\underline{\text{CH}}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 420, 516, 554, 591, 650; **EM FAB<sup>+</sup>**: 593 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

### 3.7.4.3 Acoplamento às unidades glicosídicas

#### 3.7.4.3.1 Reacção com 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose

a) Síntese de 5-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosiloxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatóníquel(II) (51) e 5-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosiloxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirinatóníquel(II) (52)

A uma solução da porfirina **49** (7,0 mg, 10,8  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (2 mL) adicionou-se 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose (45 mg, 0,11 mmol, 10 eq.) e carbonato de potássio (18 mg). A mistura foi deixada a agitar durante 4 horas à temperatura ambiente. Após este período, depois de ter confirmado por TLC que toda a porfirina de partida tinha sido consumida, evaporou-se a DMF por arrastamento de vapor.

O resíduo foi retomado em clorofórmio e lavado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, após concentração, foi cromatografada em TLC preparativa usando clorofórmio como eluente. Obtiveram-se duas frações, sendo a maioritária aquela que apresenta um menor  $R_f$ . Os produtos foram cristalizados em clorofórmio/éter de petróleo, correspondendo o principal ao isômero  $\beta$ , **51**, (8,6 mg, 81%), e o minoritário ao isômero  $\alpha$ , **52**, (1,0 mg, 9%).

Isômero  $\beta$  (**51**): **p.f.**: 139-141 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 2.05, 2.07, 2.08, 2.14 (4s, 12H,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 3.95 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.97-4.05 (m, 1H, Glc-H5), 4.23 (dd,  $J$ = 12.6, 2.0 Hz, 1H, Glc-H6), 4.41 (dd,  $J$ = 12.6, 4.4 Hz, 1H, Glc-H6), 5.23-5.30 (m, 1H, Glc-H4), 5.36-5.46 (m, 2H, Glc-H2, H3), 5.98 (d,  $J$ = 7.9 Hz, 1H, Glc-H1), 6.30 (d,  $J$ = 15.5 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ), 7.26-7.30 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.53-7.61 (m, 6H, 10,20-Ar-*o* e *m*-H), 8.82 (d,  $J$ = 4.7 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 8.91 (d,  $J$ = 5.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.05 (d,  $J$ = 4.7 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.41 (d,  $J$ = 5.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.70 (s, 1H, *meso*-H), 10.01 (d,  $J$ = 15.5 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 426, 540, 582; **EM FAB $^+$** : 978 ( $\text{M}^+$ )

Isômero  $\alpha$  (**52**): **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : neste espectro os sinais da unidade glicosídica são difíceis de identificar, no entanto a  $\delta$  6,63 ppm surge a ressonância do próton anomérico na forma de um duplete ( $J$  = 3,7 Hz). Quanto à zona aromática é idêntica à do isômero  $\beta$  (ver estudo comparativo dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos 2 isômeros,  $\alpha$  e  $\beta$ ). **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 426, 540, 582; **EM FAB $^+$** : 978 ( $\text{M}^+$ )

#### **b) Síntese da 5-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosiloxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina (**53**)**

Procedimento idêntico ao anterior para o acoplamento da 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose ao complexo de níquel da porfirina **50**.

A uma solução da porfirina **50** (6,2 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (2 mL) adicionou-se 1-bromo-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosose (106 mg, 0,26 mmol, 26 eq.) e carbonato de potássio (20 mg). A mistura foi deixada a agitar durante 24 horas à

temperatura ambiente. Após este período, foi confirmado por TLC que toda a porfirina de partida tinha sido consumida, mas desta vez observou-se apenas a formação de um produto, que corresponde ao isômero  $\beta$ . Evaporou-se a DMF por arrastamento de vapor, e o produto (8,7 mg, 94%) foi obtido directamente por cristalização em clorofórmio/metanol. **p.f.**: 248-249 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.83 (s, 2H, NH), 2.05, 2.07, 2.08, 2.14 (4s, 12H,  $\text{CH}_3\text{CO}_2$ ), 4.02 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.08 (ddd,  $J$ = 9.4, 4.2, 2.1 Hz, 1H, Glc-H5), 4.28 (dd,  $J$ = 12.5, 2.1 Hz, 1H, Glc-H6), 4.45 (dd,  $J$ = 12.5, 4.2 Hz, 1H, Glc-H6), 5.30 (t,  $J$ = 9.4 Hz, 1H, Glc-H4), 5.42-5.53 (m, 2H, Glc-H2, H3), 6.10 (d,  $J$ = 7.8 Hz, 1H, Glc-H1), 6.79 (d,  $J$ = 15.3 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ), 7.36-7.39 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.69 (t,  $J$ = 8.0 Hz, 2H, 10,20-Ar-*m*-H), 7.79-7.83 (m, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 9.01 (d,  $J$ = 3.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.05 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.30 (d,  $J$ = 3.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 9.54 (d,  $J$ = 6.0 Hz, 2H,  $\beta$ -H), 10.20 (s, 1H, *meso*-H), 10.44 (d,  $J$ = 15,3 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 425, 519, 560, 592, 652; **EM FAB $^+$** : 923(M+H) $^+$

#### 3.7.4.3.2 Síntese da 5-[2-(1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosil-6-oxicarbonil)etenil]-10,20-bis(3-metoxifenil)porfirina

A uma solução da porfirina **50** (4,5 mg, 7,6  $\mu\text{mol}$ ) em DMF seca (2 mL) adicionou-se 6-iodo-1,2:3,4-di-*O*-isopropilideno- $\alpha$ -D-galactopiranosose (71 mg, 0,19 mmol, 25 eq.) e carbonato de potássio (20 mg). A mistura foi deixada a agitar durante 24 horas a 80 °C. Depois adicionou-se água à mistura e a DMF foi evaporada por arrastamento de vapor. O resíduo foi retomado em clorofórmio e lavado com água. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o produto foi então purificado por cromatografia de coluna usando clorofórmio como eluente. A porfirina **54** (5,7 mg, 90%) foi obtida por cristalização em clorofórmio/éter de petróleo. **p.f.**: 114-116 °C; **RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : -2.89 (s, 2H, NH), 1.37, 1.42, 1.55, 1.62 [4s, 12H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ], 4.32 (dt,  $J$ = 5.4, 1.8 Hz, 1H, Gal-H5), 4.40-4.46 (m, 2H, Gal-H2, H4), 4.57-4.74 (m, 3H, Gal-H3, H6), 5.65 (d,  $J$ = 4.8 Hz, 1H, Gal-H1), 6.86 (d,  $J$ = 15.6 Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ), 7.35-7.39 (m, 2H, 10,20-Ar-*p*-H), 7.69 (t,  $J$ = 8.0 Hz, 2H, 10,20-Ar-*m*-H), 7.79-7.83 (m, 4H, 10,20-Ar-*o*-H), 9.01, 9.03, 9.30, 9.53 (4d,  $J$ = 4.8 Hz, 8H,  $\beta$ -H), 10.19 (s, 1H, *meso*-H), 10.36 (d,  $J$ = 15,6 Hz, 1H,

$\text{CH}=\text{CHCO}_2$ ); **UV-Vis.**  $\lambda_{\text{máx.}}$  nm em  $\text{CHCl}_3$ : 421, 516, 555, 591, 649; **EM FAB<sup>+</sup>**: 835 (M+H)<sup>+</sup>

### 3.8 Parte experimental dos ensaios biológicos

#### 3.8.1 Meios, reagentes, solventes, material e equipamento utilizado

O meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), utilizado para as culturas de células em crescimento (DME 8%) é preparado a partir de meio DME (500 mL), ao qual se adiciona 8% de soro fetal de vitela (FCS, “fetal calf serum”) da Gibco (40 mL) e 0,2% de gentamicina (1 mL).

O meio Eagle modificado por Dulbecco (DME), utilizado para a manutenção de células em culturas (DME 2%) é preparado a partir de meio DME (500 mL) da Gibco ao qual se adiciona 10 mL (2%) de soro fetal de vitela (FCS) e 0,2% de gentamicina (1 mL).

O tampão fosfato salino (PBS), sem cálcio e sem magnésio, foi preparado pela dissolução de: cloreto de sódio (8 g/L), cloreto de potássio (0,2 g/L), hidrogenofosfato de sódio (1,44 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), di-hidrogenofosfato de potássio (0,2 g/L) em água bidestilada.

O Sephadex (10 g) foi esterilizado a seco num frasco de 500 mL, ao qual, depois de arrefecer adicionou-se DME 2% (500 mL), deixando-se a hidratar a 4 °C durante 24 horas.

Os meios de cultura foram adquiridos estéreis assim como o material de plástico descartável. O material que não era estéril e o PBS, foram esterilizados por autoclavagem.

Todos os outros reagentes e solventes eram produtos comerciais, pelo menos, de grau analítico.

Todo o material e meios contaminados, depois de utilizados foram autoclavados para destruição dos seres patogénicos, e embalados para posterior destruição.

O ambiente estéril necessário para a realização do trabalho com os vírus, foi criado no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical, da Telstar, modelo Bio II-B.

Os espectros de visível das placas de 96 poços foram registados num espectrofotómetro Sanofi LP - 400 do Diagnostics Pasteur.

#### **3.8.2 Material porfirínico**

As porfirinas foram sintetizadas e caracterizadas por nós e foram usadas assim nos ensaios biológicos. Os compostos não-catiónicos foram dissolvidos em DMSO, enquanto que os catiónicos foram dissolvidos em PBS.

Para a preparação das soluções “stock” das porfirinas **1**, **11**, **17** e de **19** à **37** (ver anexos 2a e 2b) dissolveram-se 4 mg de cada um dos compostos; os não-catiónicos (**1**, **17**, de **19** a **31** e **34**) foram dissolvidos em DMSO (500 µL) enquanto que os catiónicos (**11**, **32**, **33** e de **35** a **37**) foram dissolvidos em PBS (500 µL). A partir destas soluções, mantidas no frigorífico e protegidas da luz, foram preparadas todas as outras mais diluídas, por adição de meio (DME a 8% ou 2%) ou de PBS, consoante os testes. As concentrações vêm expressas em µg/mL.

#### **3.8.3 Manutenção da linha celular e preparação de placas de teste com células**

As células de cultura Vero foram adquiridas à American Type Culture Collection (ATCC) com a referência CCL81. As linhas celulares foram mantidas numa incubadora em frascos de 75 ou 175 cm<sup>2</sup> (T<sub>75</sub> ou T<sub>175</sub>), entreabertos, com meio DME 8% da Gibco e 0,2% de gentamicina, sob atmosfera húmida, CO<sub>2</sub> a 5% e a 37 °C.

Quando as células formavam uma camada confluenta, cerca de 250 000 células/cm<sup>2</sup>, foram transferidas para efectuar subculturas ou para preparar placas de testes, deixando as

restantes (ou apenas as necessárias) para a continuação da linha. Assim, mais ou menos de 2 em 2 ou de 3 em 3 dias, consoante o número de células que deixávamos para a manutenção da linha, tivemos que “passar” células. A evolução da formação da monocamada é seguida por observação directa das células ao microscópio óptico invertido.

O processo de “passagem” inicia-se rejeitando o meio de cultura (DME 8%) e lavando as células com PBS a 37 °C (2 x 7 mL), tomando como exemplo um frasco T<sub>75</sub>. Depois de lavadas adicionou-se às células uma solução de tripsina (5 mL), agitando-a suavemente sobre estas e deixando apenas solução suficiente para cobrir as células, rejeitando o restante. As células foram a incubar a 37 °C durante cerca de 10 minutos, até que todas se encontrassem descoladas da placa e umas das outras.

Ressuspenderam-se as células em DME 8% (5 a 10 mL) e com a ajuda de um microscópio óptico determinou-se o número de células individuais viáveis existentes no frasco. Esta determinação foi efectuada por quantificação directa numa câmara de Neubauer (hemocitómetro). Esta câmara é constituída por dois campos que comportam, cada um, um volume de suspensão igual a 0,1 mm<sup>3</sup>. Se em cada campo da câmara tivermos em média 100 células, isto significa que temos uma densidade de 100 x 10<sup>-4</sup> células/mL. Conhecendo a taxa de crescimento destas células (aproximadamente 1,5 vezes no fim do 1º dia, dois dias depois é 2,5 e a partir daqui duplica por cada dia que passa, ou seja para o 3º dia é de 5, para o 4º dia é 10 vezes e assim por diante), sabendo a área das placas ou de cada poço para onde se iam transferir as células e a densidade celular determinada anteriormente, pode-se calcular o número de células (volume de suspensão) a transferir ou a manter no frasco para que a linha continue.

As placas para produção de vírus e as placas para os testes cultiváveis foram preparadas a partir da suspensão celular, tendo em conta os princípios para obter um tapete celular confluyente ou subconfluyente (cerca de 240 000 células/cm<sup>2</sup>). Assim, na preparação de placas P<sub>150</sub> para a produção de vírus, de placas com 96 poços para a determinação da concentração máxima não citotóxica e de placas com 12, 24 e 48 poços para a realização dos ensaios com os vírus, foi transferida uma quantidade de células capaz de, ao fim de determinado tempo, preencher cada poço com o número de células



ideal para as diferentes experiências. As placas foram deixadas na incubadora junto das células de linha.

#### **3.8.4 Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos compostos**

Em placas de 96 poços, preparadas anteriormente com células Vero em camada confluyente, rejeitou-se o meio DME a 8% e adicionou-se as soluções com diferentes concentrações de droga preparadas em DME 2% (100 µL), e DME 2% (100 µL) nas testemunhas (células sem droga, controlos). Cada poço representa uma experiência individual, e neste caso realizámos triplicados. As células foram incubadas, nas condições já conhecidas e o seu estado morfológico foi seguido por observação directa ao microscópio óptico invertido.

Após 48 horas de incubação, o meio foi removido e adicionou-se uma solução de vermelho neutro a 1% (30 µL) a cada poço, deixando-se uma hora a incubar. Depois de rejeitar e lavar 2 vezes com PBS o excesso de corante, este foi extraído por adição de 200 µL de tampão etanol-Sorensen (1:1) a cada poço. Agitou-se suavemente a placa, e as absorvências de cada poço foram registadas a 620 nm num espectrofotómetro (Sanofi LP – 400 do Diagnostics Pasteur). As absorvências dos poços que estiveram com droga foram então comparadas com as dos poços que estiveram sem droga (controlos).

#### **3.8.5 Produção de vírus**

Os vírus ensaiados, o HSV tipo 1 *Angellotti* e o HSV tipo 2 estirpe selvagem, foram obtidos da ATCC.

Os vírus utilizados nos testes foram produzidos a partir dos anteriores, em geral em placas P<sub>150</sub> com o tapete de células subconfluyente (240 000 células/cm<sup>2</sup>). O meio DME 8% é removido das placas e as células foram inoculadas com 3 mL de uma suspensão viral em DME 2% contendo aproximadamente 0,1 unidades formadoras de placa por célula

(UFP/célula). Deixou-se na incubadora durante 1 hora a adsorver, agitando de 15 em 15 minutos, adicionando-se em seguida meio DME 2% (15 mL).

Deixou-se o vírus a replicar na incubadora até se observar efeito citopático total. Quando se verificou efeito citopático total, cerca de 48 horas após a infecção das células, o conteúdo das placas foi recolhido com uma pipeta para tubos universais e a suspensão foi sujeita a centrifugação (2000 rpm durante 30 minutos a 4 °C). O sobrenadante contendo o vírus extracelular foi transferido para um frasco de vidro, fez-se o controlo de esterilidade à suspensão viral obtida e guardou-se a 4°C ou a -80 °C.

### 3.8.6 Titulação de vírus

Tomando como exemplo uma placa de 24 poços, depois de se desprezar o meio de crescimento das células, inoculou-se cada poço com 100 µL de sucessivas diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) de suspensões virais em DME 2%.

Após adsorção do vírus (60 minutos a 37 °C, agitando de 15 em 15 minutos) as células foram cobertas com Sephadex G50 a 2% (m/v) em DME 2% (1mL). Deixou-se na incubadora durante 3 dias. Findo este período as células foram fixadas por tratamento com uma solução aquosa de formaldeído a 5% e incubadas cerca de uma hora na estufa a 37 °C. As placas foram depois lavadas cuidadosamente com água da torneira (em plano inclinado). De seguida as placas de lise foram reveladas por coloração das células com uma solução de violeta de cristal 0,5% (até cobrir todas as células). O excesso de corante foi lavado com água da torneira (é necessário ter cuidado para não descolar as células) e depois a placa foi seca sobre uma folha de papel.

O título da suspensão viral foi determinado como sendo o número de placas de lise formadas por mililitro de suspensão (UFP/mL); estas foram contadas com a ajuda de uma lupa.

### **3.8.7 Estudos de inativação dos vírus na presença das drogas**

#### **3.8.7.1 Efeito na formação de placas**

O vírus foi titulado pelo método de formação de placas descrito anteriormente (titulação de vírus), havendo no entanto algumas alterações.

Para este efeito preparámos assim várias diluições sucessivas de vírus em meio DME 2% com droga na CMNC e sem droga (controlo). Inoculámos cada suspensão de vírus nos poços e depois da adsorção adicionámos Sephadex G50 a cada poço (1 mL), também preparado com meio DME 2% na CMNC. Nos controlos adicionámos Sephadex sem droga.

O número de placas de lise formado pelos vírus com droga foi comparado com o número de placas de lise formado pelo vírus sem droga. Os resultados vêm expressos como percentagem de redução de placas em relação ao controlo sem droga.

#### **3.8.7.2 Efeito no ciclo replicativo viral**

Rejeitou-se o meio DME 8% das células em camada subconfluente em placas de 12 poços, as quais foram pré-tratadas com DME 2% contendo droga na CMNC (1 mL) durante 30 minutos a 37 °C, agitando de 10 em 10 minutos. Após esta incubação, rejeitou-se o meio anterior, e procedeu-se à adsorção de uma suspensão de vírus (200 µL) preparada no mesmo meio com droga. Após 1 hora de adsorção do vírus, agitando de 15 em 15 minutos, adicionou-se meio DME 2% com droga na CMNC (1,8 mL). O vírus foi deixado a replicar durante 24 horas, onde se observou efeito citopático, pelo menos nos poços de controlo (vírus sem droga). O conteúdo de cada poço foi recolhido para eppendorfs, centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos e titulado em seguida pelo método de formação de placas.

Neste caso, comparámos as placas de lise formadas por vírus replicados em células com droga, com as placas de uma suspensão viral sujeita às mesmas condições na ausência de droga.

### 3.8.7.3 Efeito directo ou virucida

Uma suspensão viral (3 mL) foi concentrada numa ultracentrífuga a 44000g durante uma hora a 4 °C, de modo a obter um sedimento com aproximadamente  $10^7$  (UFP). O sedimento foi ressuspenso em PBS contendo droga na concentração máxima não citotóxica (500 µL). Manteve-se o vírus a incubar durante uma hora, sob agitação, num banho de água a 37 °C. Em seguida adicionou-se PBS gelado (2,5 mL) e a suspensão viral foi novamente centrifugada a 44000g durante uma hora a 4 °C. O sedimento viral sujeito a tratamento foi então ressuspenso em DME 2% (1 mL) correspondendo deste modo à diluição  $10^{-1}$ . A partir desta suspensão prepararam-se as outras diluições sucessivas. O vírus foi titulado pelo método de formação de placas, já descrito.

O efeito directo das drogas sobre os vírus foi quantificando, comparando o número de partículas virais infecciosas (placas) do vírus tratado com droga, com um controlo sujeito ao mesmo procedimento mas sem droga. Os resultados vêm mais uma vez expressos como percentagem de redução de placas em relação ao controlo sem droga.

### 3.9 Referências

1. G. A. Wistreich, “Microbiology Laboratory – Fundamentals and Applications”, Prentice Hall, Nova Jérsea, **1984**, 332.
2. M. J. Pelczar Jr., E. C. S. Chan, N. R. Krieg, “Microbiologia - Conceitos e Aplicações”, Makron Books, São Paulo, **1997**, vol. 2.
3. Z. Malik, H. Ladan, B. Ehrenberg, Y. Nitzan, “Photodynamic Therapy. Basic Principles and Clinical Application”, B. W. Henderson, T. J. Dougherty (Ed), Marcel Dekker, Nova Iorque, **1992**, cap.8, 97.
4. Página da internet: <http://saude.sapo.pt/gkBD/119245.html>
5. “Herpes labial: o vírus adormecido”, Teste Saúde, **1999**, 18, 20.
6. “Vírus do Herpes Está a Aumentar”, Jornal de Notícias (edição electrónica), **28-03-2001**.
7. “Varicela que leva à cegueira”, Jornal de Notícias (edição electrónica), **28-03-2001**.
8. B. M. Libin, **1999**, Patente nº US5855872.
9. J. North, H. Neyndorff, J. G. Levy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1993**, 17, 99.
10. S. Legrand-Poels, M. Hoebeke, D. Vaira, B. Rentier, J. Pirte, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1993**, 17, 229.
11. Z. Smetana, E. Mendelson, J. Manor, J. E. van Lier, E. Ben-Hur, S. Salzberg, Z. Malik, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1994**, 22, 37.
12. Página da internet: <http://www.lumacare.com/paper14.htm>
13. Página da internet: <http://www.lumacare.com/paper8.htm>
14. R. C. Straight, W. G. Stroop, J. D. Spikes, J. A. Dixon, “Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases”, G. Jori, C. Perrin (Ed), Libreria Progetto Editore, Pádua, **1985**, 353.
15. H. J. Alter, P. A. Morel, B. P. Dorman, G. C. Smith, R. P. Creagan, G. P. Wieseahn, L. Corash, H. Popper, J. W. Eichberg, *The Lancet*, **1988**, 31, 1446.
16. W. D. Dixon, G. L. Marzilli, F. R. Schinazi, **1989**, Patente nº WO89/11277.
17. D. Brault, D. Ingrand, B. Aveline, M. Grandadam, C. Vever-Bizet, **1994**, patente nº FR2696756.
18. W. D. Dixon, F. R. Schinazi, G. L. Marzilli, **1992**, Patente nº US5109016.
19. B. S. Kahl, S. C. Craik, **1994**, Patente nº WO9405285.

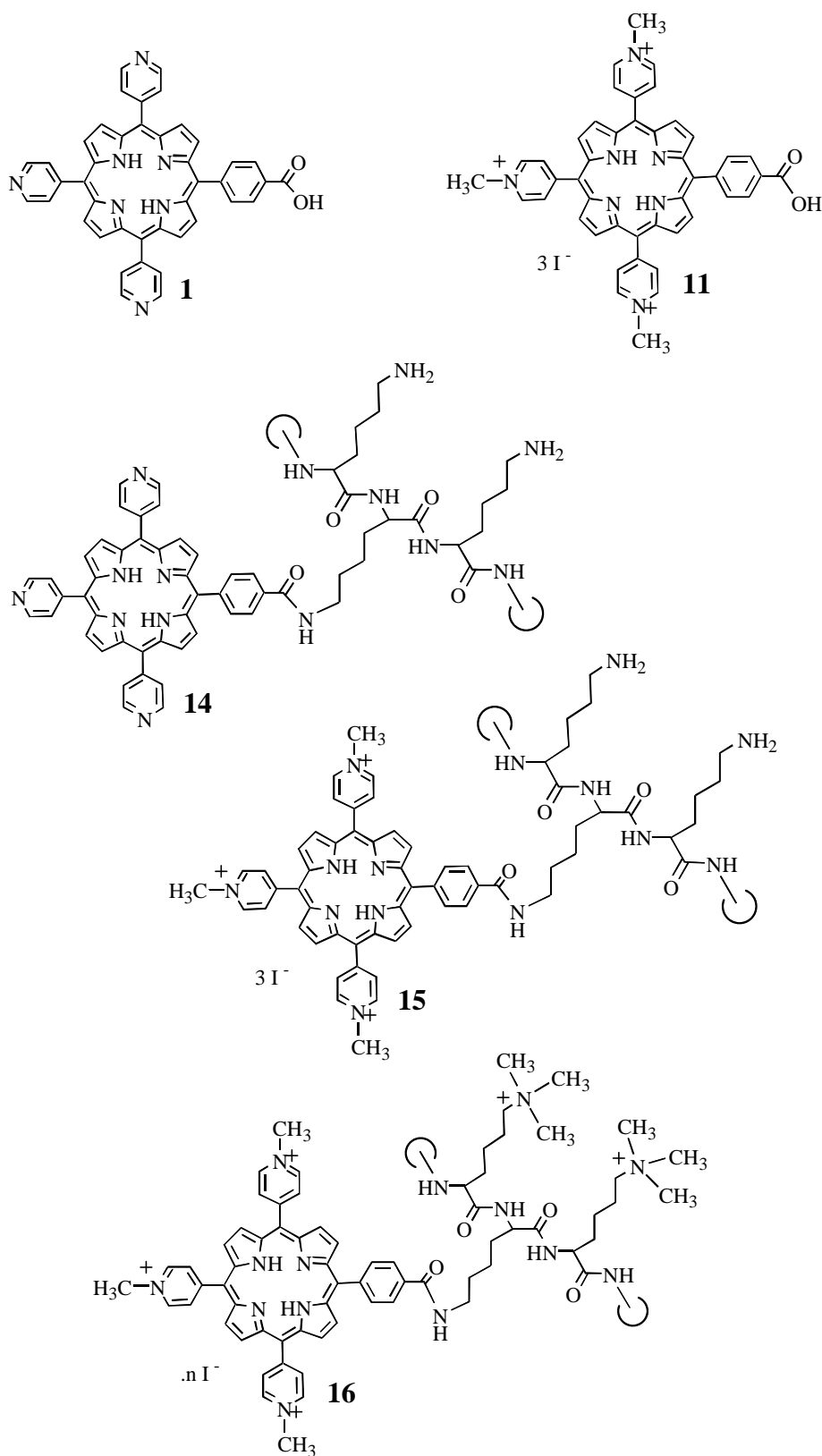
20. H. K. Hombrecher, S. Ohm, D. Koll, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 5441.
21. Y. Mikata, Y. Onchi, K. Tabata, S. Ogura, I. Okura, H. Ono, S. Yano, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 4505.
22. K. Driaf, R. Granet, P. Krausz, M. Kaouadji, F. Thomasson, A. J. Chulia, B. Verneuil, M. Spiro, J. C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.*, **1996**, 74, 1550.
23. G. Fulling, D. Schroder, B. Franck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1519.
24. M. Cornia, M. Menozzi, E. Ragg, S. Mazzini, A. Scarafoni, F. Zanardi, G. Casiraghi, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 3977.
25. C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 331.
26. O. Gaud, R. Granet, M. Kaouadji, P. Krausz, J. C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.*, **1996**, 74, 481.
27. I. Dubey, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 3088.
28. T. S. Rao, K. Jayaraman, G. R. Revankar, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 6189.
29. P. Kubát, K. Lang, P. Anzelbacher Jr., K. Jursíková, V. Král, B. Ehrenberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 933.
30. J. M. Nussbaum, M. E. A. Newport, M. Mackie, N. B. Leontis, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 59, 515.
31. A. M. A. R. Gonsalves, J. M. T. B. Varejão, M. M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 635.
32. G. Fulling, D. Schroder, B. Franck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, 28, 1519.
33. K. F. Bastow, P. Akanitapichat, "Burger's Medicinal Chemistry, and Drug Discovery-Therapeutic Agents", M. E. Wolff (Ed), John Wiley & Sons, Nova Iorque, **1997**, vol. 4, cap. 56, pag 487.
34. P. J. Garegg, B. Samuelsson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1980**, 2866.
35. B. Classon, Z. Liu, *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 6126.
36. Q. M. Wang, D. W. Bruce, *Synlett*, **1995**, 1267.
37. N. B. Finter, *J. Gen. Virol.*, **1969**, 5, 419.
38. C. E. Saldanha, J. Lubinski, C. Martin, T. Nagashunmugam, L. Wang, H. van der Keyl, R. Tal-Singer, H. M. Friedman, *J. Virology*, **2000**, 74, 6712.
39. D. M. Coen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1990**, 616, 224.
40. D. M. Coen, *Trends Microbiol.*, **1994**, 2, 481.

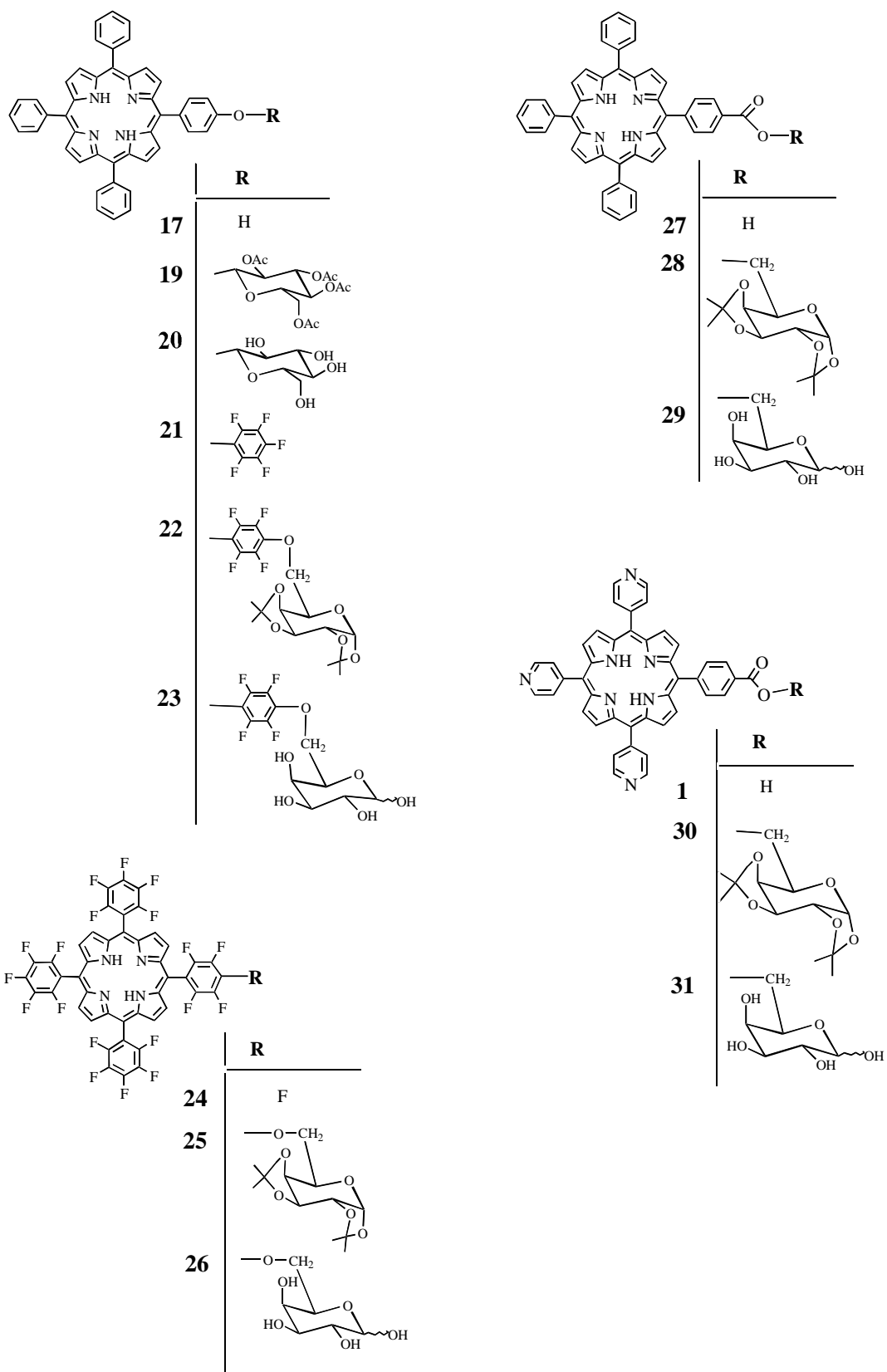
41. S. A. Priola, A. Raines, W. S. Caughey, *Science*, **2000**, 287, 1503.
42. R. J. Fiel, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, 6, 1259.
43. M. Bennett, A. Krah, F. Wien, E. Garman, R. Mckenna, M. Sanderson, S. Neidle, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, 97, 9476.

## **Anexos**





**Anexo 1** Compostos testados nos ensaios bacteriológicos

**Anexo 2a** Compostos testados nos ensaios antivirais

**Anexo 2b** Compostos testados nos ensaios antivirais (cont.)